

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-249112

(43)公開日 平成5年(1993)9月28日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/531	B	8310-2 J		
33/535		8310-2 J		
// C 1 2 Q 1/34		6807-4B		

審査請求 未請求 請求項の数19(全 26 頁)

(21)出願番号 特願平4-262661

(22)出願日 平成4年(1992)8月18日

(31)優先権主張番号 7 4 7 0 8 2

(32)優先日 1991年8月19日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 391039243

シンテックス(ユー・エス・エイ)インコーポレイテッド

SYNTEX(U. S. A.) INCORPORATED

アメリカ合衆国94304カリフォルニア州
パロ・アルト、ヒルビュー・アベニュー
3401番

(72)発明者 レミィ クローマー

アメリカ合衆国カリフォルニア州サン
ジョゼ、コロンボドライブ 426

(74)代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 酵素阻害剤を使用する均質系免疫検定法

(57)【要約】

【目的】 本発明は、改良された酵素阻害剤を使用する均質系免疫アッセイを提供する。

【構成】 本発明の免疫アッセイにおいて分析対象物は特異的結合対を構成する。本アッセイ方法は：水性媒体中に、試料、第1の特異的結合対構成体に結合される酵素、および第2の特異的結合対構成体に結合される該酵素に対する阻害剤を合せ、ここにおいて各特異的結合対構成体は、分析対象物、または分析対象物に相補的な特異的結合対構成体に結合可能であり；前記酵素活性について媒体を分析し；およびこの活性を、媒体中に存在する分析対象物の量に関連付けることを含む。本発明は、該アッセイ用の組成物およびキットも包含している。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 特異的結合対構成体である分析対象物を含有すると予想される試料中の前記分析対象物の存在を測定するに際し：

(a) 水性媒体中に、前記試料、第1の特異的結合構成体に結合される酵素、および第2の特異的結合対構成体に結合される前記酵素に対する阻害剤を共に合せ、ここにおいて前記特異的結合対構成体は、それぞれ前記分析対象物に対して結合可能、あるいは前記分析対象物に相補的なs b p構成体に対して結合可能であり；

(b) 前記媒体を前記酵素活性について分析し；および

(c) 前記活性を前記媒体中に存在する分析対象物の量に関連付けること、を含んでなる分析対象物の存在の測定方法。

【請求項2】 前記酵素が、前記第1の特異的結合対構成体の少なくとも1個の分子に結合される請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記酵素が、同酵素の触媒部位あたりに結合される前記第1の特異的結合対構成体の少なくとも3個の分子を有してなる請求項2に記載の方法。

【請求項4】 前記阻害剤の少なくとも1個の分子が、前記第2の特異的結合対構成体の結合部位に結合される請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記阻害剤の少なくとも3個の分子が、前記第2の特異的結合対構成体の結合部位に結合される請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記第2の特異的結合対構成体が抗体であり、前記第1の特異的結合対構成体が抗原である請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記第1の特異的結合対構成体が前記酵素に結合していない場合に、前記第2の特異的結合対構成体に結合する前記阻害剤が、 $10^{-2} \sim 10^{-8}$ Mの範囲の解離定数をもって前記酵素に結合する請求項1に記載の方法。

【請求項8】 前記酵素が β -ガラクトシダーゼである請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記酵素阻害剤が、置換ピペリジン類および置換ピラン類からなる群から選択される請求項11に記載の方法。

【請求項10】 前記分析対象物が薬剤または薬剤代謝物であり、好ましくは前記薬剤がジゴキシンまたはシクロスポリンである請求項1に記載の方法。

【請求項11】 試料中の分析対象物の量を免疫アッセイにより測定するに際して：

(a) 媒体中において2種の相補的s b p構成体の間で複合体を形成し、ここで前記s b p構成体はリガンドおよびレセプタであり；

(b) 前記複合体の量を検出するために前記媒体を分析し；および

(c) 前記複合体の量を試料中の分析対象物の量に関連

付けること、を含んでなり、ここにおいて改良点が、前記s b p構成体の一つに結合される酵素および他のs b p構成体に結合される前記酵素に対する阻害剤の使用を含んでなる免疫検定方法。

【請求項12】 前記酵素が前記リガンドに共有的に結合され、かつ前記阻害剤が前記レセプタに共有的に結合される請求項11に記載の方法。

【請求項13】 前記レセプタが前記リガンド標識酵素に結合していない場合に、前記レセプタに結合する前記阻害剤が、前記酵素活性の阻害について $10^{-2} \sim 10^{-8}$ Mの K_i を有する請求項12に記載の方法。

【請求項14】 分析対象物を含有すると予想される試料中の該分析対象物の存在を測定するに際し：水性媒体中に、前記試料、酵素と分析対象物類似体との第1の接合体、および前記酵素の阻害剤と前記分析対象物の抗体との第2の接合体を合し、ここにおいて前記第2の接合体の第1の接合体に対する結合が、前記媒体中の分析対象物の存在により調節され；および、前記媒体中の酵素活性を測定すること、を含む免疫検定方法。

【請求項15】 酵素に結合する第1の特異的結合対構成体、および前記酵素に対する阻害剤に結合する第2の特異的結合対構成体を含有する溶液を含んでなる成分の組成物。

【請求項16】 前記第1の特異的結合対構成体が抗原であり、前記第2の特異的結合対構成体が前記抗原に対する抗体である請求項15に記載の組成物。

【請求項17】 包装形態において、第1の特異的結合対構成体と酵素との第1の接合体、および第2の特異的結合対構成体と前記酵素に対する阻害剤との第2の接合体を含んでなる分析対象物の免疫アッセイ実施用キット。

【請求項18】 免疫グロブリンと β -ガラクトシダーゼ阻害剤との接合体を含んでなり、前記接合体は酵素基質が存在しない場合に $10^{-2} \sim 10^{-8}$ の解離定数をもって前記 β -ガラクトシダーゼに結合することを特徴とする組成物。

【請求項19】 請求項18に記載の接合体を含有するキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】酵素免疫アッセイは、診断において極めて重要な道具であり、例えば放射線の危険回避、発癌性応答検出の便利さ、放射性崩壊による試薬の不安定性回避、および酵素の1分子あたりに多くの生成物分子を生成する能力による応答の増幅の機会等を含めて、特に放射免疫アッセイに対していくつかの優位点を持っている。

【0002】酵素免疫アッセイは、酵素が特定の化学反応を促進する生物学的触媒であるという原理のうえに作

10

20

30

40

50

用する。触媒の単一分子は、触媒反応を反復することにより多数の基質分子を生成物に変換し得るため、触媒は増幅器として作用する。従って、酵素は極めて低濃度で容易に検出され得る。この感度が、酵素を免疫化学的標識として有用なものとする。試料中の分析対象物の酵素免疫アッセイにおいて、免疫反応物のひとつに接合する適切な酵素は、他の免疫反応物または分析対象物に結合され、該酵素の活性が酵素基質の生成物への転換の測定により測定される。該生成物の量は、試料中の分析対象物の量の指標である。

【0003】ELISAアッセイ等の不均質系酵素免疫アッセイにおいては、未結合酵素が酵素活性測定前に、まず結合酵素から分離される。

【0004】均質系酵素免疫アッセイとして知られている他のアッセイは、免疫反応物に結合する酵素から未結合酵素を分離する必要なしに、酵素活性の量を分析対象物の量の指標として検出する。これらのアッセイは、その活性が免疫反応物との結果として調節され得る酵素を使用する。このような方法のひとつは、酵素標識リガンドとレセプタとを使用し、ここにおいて酵素活性は、レセプタが酵素の代わりに分析対象物に結合する場合に変化する。別のこの種の方法は、酵素標識レセプタの使用、および該レセプタのリガンドへの結合に基づく酵素活性の変化の測定を含む。酵素チャネリング免疫アッセイとして知られている別の方法は、2種類の酵素が免疫化学的結合の結果として近接するようになった場合の酵素活性の変化に依存する。これらの酵素は、一方の酵素の生成物が他方の基質である点で関連している。酵素免疫アッセイの優れた総覧は、「Enzyme-Immunoassay」、Edward T. Maggio 編、CRC Press Inc. (1980) に示されている。

【0005】均質的酵素免疫アッセイ方法においては、抗体による酵素試薬の活性の適切な調節がしばしば困難であり、またある酵素はほとんどまたは全く調節を与えない。本発明は、均質系酵素免疫アッセイにおける改良を提供するものであり、ここにおいて従来は酵素免疫アッセイで有用ではなかった酵素の活性調節が可能となり、もって均質系酵素免疫アッセイ法の多面的機能および感度を増大する。

【0006】

【従来の技術】抗-酵素抗体類は、酵素活性調節剤として記述されている。NgoらのFEBS Letters 116 (2) : 285-288 (1980) では、酵素調節剤が分析対象物に類似するリガンドに共有的に連結され、しかして酵素活性の調節が可能な調節剤の量が、存在する分析対象物の量に依存する。例えば、抗-西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP) 抗体により標識されたリガンドは、抗-分析対象物抗体への結合について分析対象物と競合する。HRPの添加により、残存す

る任意のリガンド-標識抗-HRP抗体がHRPと結合し、これが酵素的に不活性となる。

【0007】米国特許第4,686,181号では、抗-酵素抗体が、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (G6PDH) の活性阻害のために使用される。抗-G6PDHは、分析対象物または分析対象物の類似体に接合される。分析対象物を含有する液体媒体は、分析対象物に対する結合剤、抗-G6PDH-接合体、およびG6PDHと合せられる。次いで、G6PDH活性が測定される。SkoldらのJournal of Immunology 138 (10) : 3408-3414 (1987) も、G6PDH活性の調節のための抗-G6PDHの使用を記述している。

【0008】IgG抗体も酵素活性調節剤として記述されている。WeiらのClin. Chem. 23

(8) : 1386-1388 (1977) は、IgGによる酵素活性の阻害を記述している。IgGがホスホリパーゼCにより標識された抗-IgG抗体に結合した場合に、ホスホリパーゼC活性は抑制される。該酵素の触媒部位は、多分マスクされ、これがその基質との相互作用を妨げる。

【0009】ハイブリッド抗体が酵素調節剤として記述されている。AshiharaらのJournal of Clinical Laboratory Analysis 1 : 77-79 (1987) には、抗体または酵素に競合的に結合でき、また酵素活性を阻害し得るハイブリッド抗体が記述されている。

【0010】化合物もまた酵素活性の調整に使用されている。英国特許第1,595,101号は、リガンドまたはリガンドのレセプタに結合される調節剤を使用する酵素調節剤免疫アッセイが記述されている。該アッセイは、調節剤標識構成体と分析対象物との間の複合体の形成、および引続く酵素および基質のアッセイ混合物への添加、ならびに酵素活性の測定を含む。Miyakeらは、Agric. Biol. Chem. 52 (7) : 1649-1654 (1988) に、 β -ガラクトシダーゼの酵素活性を阻害し得る数種の化合物を記述している。

【0011】抗-酵素抗体または化合物のいずれかの阻害剤が、酵素活性の低減に使用されている。EPO第0,270,691号は、固相に結合されている抗体または抗原が、アッセイされるべき試料、および酵素標識抗体または抗原と組合わされる。酵素阻害剤と結合される不溶性固体担体が、抗原-抗体反応の後の液体に添加され、液体中に存在する未反応の酵素-標識抗体または抗原中の酵素活性を低減する。

【0012】発明の要約

本発明は、特異結合対 (sbp) 構成体である分析対象物を含むと予想される試料中の該分析対象物の存在の測定方法に関連する。該方法は、(a) 水性媒体中に、前

記試料、第1の特異的結合対構成体に結合される酵素、および第2の特異的結合対構成体に結合される前記酵素に対する阻害剤を共に合せ、ここにおいて前記特異的結合対構成体は、それぞれ前記分析対象物に対して結合可能、あるいは前記分析対象物に相補的なs b p構成体に対して結合可能であり；(b)前記媒体を前記酵素活性について分析し；および(c)前記活性を前記媒体中に存在する分析対象物の量に関連付けること、を含む。

【0013】本発明は、試料中の分析対象物の量測定のための改良された免疫アッセイにも関連し、該アッセイは、(a)媒体中において2種の相補的s b p構成体の間で複合体を形成し、ここで前記s b p構成体はリガンドおよびレセプタであり；(b)前記複合体の量を検出するために前記媒体を分析し；および(c)前記複合体の量を試料中の分析対象物の量に関連付けることを含む。改良点は、前記s b p構成体のひとつに結合される酵素および他のs b p構成体に結合される前記酵素に対する阻害剤の使用を含んでなる。

【0014】更に、本発明は、分析対象物を含むと予想される試料中の該分析対象物の存在を測定する免疫アッセイに関し、ここで(1)試料、(2)酵素と分析対象物類似体との第1の接合体、および(3)前記酵素の阻害剤と前記分析対象物の抗体との第2の接合体を、水性媒体中に合せる。第2の接合体の第1の接合体に対する結合は、該媒体中の分析対象物の存在により調節される。次いで、該媒体の酵素活性が測定される。

【0015】本発明は、成分の組成物にも関する。本発明の成分の組成物のひとつは、酵素に結合する第1の特異的結合対構成体、例えば抗原、および該酵素に対する阻害剤に結合する第2のs b p構成体、例えば抗体の溶液である。本発明の別の組成物は、酵素に共有的に結合する分子量2000未満の薬剤、および該酵素に対する通常は競合的阻害剤である阻害剤に共有的に結合する該薬剤に対する抗体の溶液である。本発明の更に別の組成物は、 β -ガラクトシダーゼに結合する分子量2000未満の薬剤、および β -ガラクトシダーゼに対する通常は競合的阻害剤である阻害剤に共有的に結合する該薬剤に対する抗体の溶液である。

【0016】更に、本発明は、分析対象物の免疫アッセイを行なうためのキットに関し、これは包装形態において、第1の特異的結合対構成体と酵素との第1の接合体、および第2の特異的結合対構成体と前記酵素に対する阻害剤との第2の接合体を含んでなる。

【0017】本発明は、免疫グロブリンと、 β -ガラクトシダーゼの例えば競合的な阻害剤との接合体に関し、ここにおいて該接合体は、酵素基質の不在下で 10^{-2} ～ 10^{-8} Mの解離定数をもって β -ガラクトシダーゼと結合する。本発明は、 β -ガラクトシダーゼの阻害剤として有用な新規化合物にも関連する。

【0018】特定の実施態様の記述

本発明の特定の実施態様の記述に更に進む前に、多くの用語を定義しておく。

【0019】分析対象物：測定されるべき化合物もしくは組成物、興味ある成分であって通常は特異的結合対の構成体であり、またリガンドであってもよく、通常抗原性もしくはハプテン性の、少なくとも1個の共通結合もしくは決定部位を共有する単一または複数の化合物、またはレセプタである。リガンド分析対象物は、1価または多価であることにより特徴付けられ、その一方レセプタ分析対象物は、単一または複数の結合部位を有してもよい。

【0020】分析対象物の厳密な性質は、興味ある分析対象物の多くの例と共に、ここに参考として組入れる米国特許第4,299,916号の第16～23欄、および米国特許第4,275,149号の第17および18欄に開示されている。

【0021】多価分析対象物は、一般にはポリ(アミノ酸)、すなわちポリペプチドおよび蛋白質、ポリサッカライド、核酸、ならびにそれらの組合わせである。そのような組合わせ、または集合体は、細菌類、ウイルス、染色体、遺伝子、ミトコンドリア、核、細胞膜等を含む。多くの場合において、多価リガンド分析対象物は、少なくとも約5,000以上の分子量、より普通には少なくとも約10,000分子量を有するであろう。ポリ(アミノ酸)の分類において、興味あるポリ(アミノ酸)は、一般に約5,000～5,000,000の分子量、より普通には約20,000～約1,000,000の分子量であり、興味あるホルモン類のうちでは、約5,000～60,000であろう。

【0022】1価のリガンド分析対象物は、一般に、約100～2,000の分子量、より普通には約125～1,000の分子量であろう。興味ある分析対象物は、薬剤、薬剤代謝物、殺虫剤、汚染物質等を含み、それらの列挙が、ここに参考として組入れる米国特許第4,806,488号の第3欄に開示されている。

【0023】有用なリガンドの列挙は、ここに参考として組入れる米国特許第4,275,149号の第12～17欄にわたる開示に見出される。

【0024】レセプタ分析対象物については、分子量は一般的には約10,000～ 2×10^6 、より普通には約10,000～ 10^6 の範囲であろう。免疫グロブリン、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMについては、分子量は一般的に約160,000から約 10^6 まで変化するであろう。天然のレセプタは、一般に少なくとも約25,000の分子量であり、 10^6 以上まで広く変化し、またアビジン、チロキシン結合グロブリン、チロキシン結合プレアルブミン、トランスコルチン、膜表面蛋白質等の成分を含む。

【0025】特異的結合対構成体("s b p"構成体)：2種類の異なる分子の一方で、表面または空隙部

分に特異的に結合し、しかして他方の分子の特定の空間的および極性組織に相補的であるとして定義される領域を有する。該 s b p の構成体は、例えば抗原-抗体等の免疫学的対の構成体のようなりガンドおよびレセプタとして言及される。免疫学的対ではない特異的結合対、例えばビオチン-アビジン、ホルモン-ホルモンレセプタ、核酸二重体、I g G-蛋白質A、DNA-DNA、DNA-RNA等も本発明に含まれる。相補的な s b p 構成体は、例えばリガンドとその相補的レセプタのように互いに結合する。s b p 構成体は、同じ相補的 s b p 構成体10に結合し得る場合には、他方の s b p 構成体に類似しており、例えば標識リガンドまたは標識レセプタを与える基による、少なくとも1個の水素原子の置換によって修飾されているリガンドまたはレセプタのいずれかであり得る。該 s b p 構成体は、分析対象物または該分析対象物の相補的 s b p 構成体に対して類似するか、または相補的であり得る。

【0026】リガンド：レセプタが天然に存在するか、または調製し得る任意の有機化合物。

【0027】抗原：抗体に結合し得るか、または抗体を生起し得る任意の化合物。20

【0028】レセプタ：例えば、エピトープ性、結合性または決定基部位等の分子の特定の空間的、極性的組織を認識し得る化合物または組成物。例示的なレセプタは、チロキシン結合グロブリン、抗体類、酵素、F a b 断片、レクチン、核酸、蛋白質A、相補成分C l q 等の天然に生じるレセプタを含む。

【0029】抗体：表面または空隙部位において特異的に結合し、しかして他の分子の特定の空間的および極性的組織に相補的であるとして定義される領域を有する免疫グロブリン。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってよく、宿主を免疫し、そして血清を採取するか（ポリクローナル）、あるいは連続的ハイブリッド継代細胞株を調製し、分泌蛋白質を採取する（モノクローナル）等のこの分野で周知の技術により調製され得る。抗体類は、完全な免疫グロブリンまたはその断片を含み、免疫グロブリンはI g A（I g A 1およびI g A 2）、I g D、I g E、I g MおよびI g G（I g G 1、I g G 2、I g G 3およびI g G 4）等の種々のクラスおよびアイソタイプを含む。断片は、F a b、F v およびF（a b'）₂、F a b' 等を含んでよい。30

【0030】分析対象物類似体またはリガンド類似体：レセプタへの結合について、分析対象物またはリガンドと競合し得る修飾分析対象物もしくは分析対象物代用物、または修飾リガンドもしくはリガンド代用物であって、修飾は、分析対象物またはリガンドが他の分子に結合する手段を与える。分析対象物類似体またはリガンド類似体は、通常は分析対象物またはリガンドとは、水素原子の化学結合による置換以上に異なり、該結合は、分析対象物類似体またはリガンド類体を、必須ではないが、50

中心または標識に連結する。分析対象物代用物またはリガンド代用物なる用語は、該分析対象物またはリガンドに相補的なレセプタに特異的に結合し得る化合物を意味する。従って、分析対象物代用物またはリガンド代用物は、分析対象物またはリガンドと同様な様式でレセプタに結合し得る。代用物は、例えば、分析対象物またはリガンドの抗体のイディオタイプに対する抗体であり得る。

【0031】阻害剤：酵素に対して可逆的に結合し、酵素活性を阻害し得る化合物または基であって、通常は競合的阻害剤である。競合的阻害は必須ではない。少なくとも必要とされることは、全く阻害されていない酵素と最大に阻害された酵素との測定可能な差異があり、この差異が分析対象物の定性的検出を許容することである。しかしながら、通常は、阻害剤により生じる活性の差異が大きいくほど、アッセイは、より高感度となり、かつ必要な濃度範囲を通じて分析対象物の定量的測定の精度が高くなる。

【0032】可逆的結合：通常は非共有結合であり、一般的には、結合した複合体の解離がいずれの成分にも全体的としての化学変化を生じないような酵素と阻害剤との結合をさす。多くの可逆的阻害剤は、競合的阻害剤である。競合的阻害剤は、酵素基質との競合において酵素に結合し、かくして基質濃度が高いほど、より不完全に結合し、より低効率で阻害する。

【0033】試料前処理：アッセイにおける選択的工程であり、標的分析対象物を1種以上のアッセイ試薬に対してより容易に利用可能とするように設計されるか、あるいはアッセイにおいて試料成分による干渉を低減するように設計される。本発明の方法により分析される試料は、細胞の分離または溶解；蛋白質類の沈殿、加水分解または変性；脂質の加水分解；分析対象物の可溶化等の前処理を受ける。このような前処理は、限定されるものではないが、遠心分離；試料のアルコール、好ましくはメタノール等の炭素数が約7個未満のアルコール等の有機溶媒による処理；および例えば水酸化ナトリウム等の洗浄剤による処理等を含む。

【0034】本発明のアッセイ方法は、s b p 構成体である分析対象物を含有すると予想される試料を、少なくとも2種類の試薬：（1）第1のs b p 構成体に結合される酵素、および（2）第2のs b p 構成体に結合される該酵素に対する阻害剤と合せることを含む。第1および第2のs b p 構成体は、それぞれ分析対象物、または該分析対象物に相補的なs b p 構成体に対して結合可能である。次いで、媒体が酵素活性について分析され、活性が媒体中に存在する分析対象物の量に関連付けられる。この発明は、ジゴキシン（d i g o x i n）およびシクロスポリン等の薬剤のアッセイにおいて特に有用性が見出される。

【0035】この発明は、阻害剤がs b p 構成体に結合

した場合に阻害剤の可逆的結合によって活性が阻害され得る任意の酵素を使用することができる。

【0036】酵素は、それらの基質、補因子、特異性、偏在性、温度安定性、至適pH、代謝回転速度等において広範囲に変化する。本質的な因子を除いて、酵素の選択においては酵素の比活性、容易に検出可能な生成物に変換される基質の入手可能性、酵素の安定性、および酵素の商業的入手可能性等、実地的な考慮がある。

【0037】操作性の観点から、広範囲の酵素が本発明において使用可能であり、基質、補因子および天然の供給源を含む列挙は、ここに参考として組入れる米国特許第3,817,837号および第4,203,802号の開示、Enzyme Nomenclature、Edwin C. Webb編、Academic Press、New York (1984) 20-470頁；Enzymes、Malcolm Dixonら、第3版、Academic Press、New York (1979)、683-972頁；Enzyme Handbook、Vol. I、IIおよびSupp. I、Thomas E. Barman、Springer-Verlag、New York (1969)のそれぞれ23-499頁、501-915頁および16-503頁；ならびにEnzyme Handbook、Vol. 1および2、D. SchomburgおよびM. Salzmann編、Springer-Verlag、New Yorkに与えられている。概略、これらにはオキシドリダクターゼ、トランスフェラーゼ、ヒドロラーゼ、リアーゼ、イソメラーゼおよびリガーゼ（シンターゼ）が含まれている。

【0038】実地的な事項として、好ましい多くの酵素群があるであろう。International Union of Biochemists (I. U. B) の分類を採用して、オキシドリダクターゼ (1.)、ヒドラーゼ (3.) およびリアーゼ (4.) が興味あり、オキシドリダクターゼおよびヒドラーゼが好ましい。オキシドリダクターゼのうち、CHOH基、アルデヒドまたはケト基、またはCH-NH₂基に対して供与体として作用するもの（それぞれ、1. 1、1. 2および1. 4）、および過酸化水素に対して受容体として作用するもの (1. 11) が好ましい。同様に好ましいものは、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドもしくはそのホスフェート、またはチトクロームを受容体とするオキシドリダクターゼ、すなわちI. U. B. 分類でそれぞれ1. X. 1および1. X. 2に分類されるものである。ヒドロラーゼのうち特に興味あるものは、グリコシル化合物に作用するもの、特にグリコシドヒドロラーゼであり、また有機または無機エステルの両者のエステル結合に作用するもの、すなわちI. U. B. 分類でそれぞれ3. 1および3. 2の群である。

【0039】商業用の酵素の選択において、科学的研究

のための単一または限定された使用に比べると、多くの望ましい基準があるであろう。酵素は、少なくとも3ヶ月、好ましくは6ヶ月間の-20℃またはそれ以上の温度における保存で安定でなければならない。

【0040】酵素は、分析対象物と同じまたはそれ以下の濃度で、基質の消失または生成物の形成の測定を通して容易に検出されなければならない。好ましくは、検出はリガンド-1セブタ結合を破壊しない条件、通常pH 4-11、普通にはpH 6-9において実施され得る。好ましくは、酵素は分析対象物の相補的s b p構成体に対する結合についての至適pHまたはその近傍に、代謝回転速度についての至適pHを有するであろう。

【0041】生成物は、酵素反応の結果として形成されるか、あるいは破壊されるものである。好ましくは、生成物は紫外または可視領域、すなわち約250-800nm、好ましくは400-700nmの光を吸収する。基質は、天然の基質または合成的に入手可能な基質である。種々のそれぞれの酵素に対する例示的な生成物および基質は、前述のEnzymes中に示されている。

【0042】好ましくは、使用される酵素、または他の類似した活性を有する酵素は、測定されるべき液体中には存在せず、あるいはアッセイ試薬の添加前に容易に除去されるか、不活性化されるものである。また、アッセイされるべき液体中に天然には阻害剤が生じない酵素を使用することが望ましい。

【0043】合成上の便宜のために、酵素のアミノ基に対してs b p構成体、特にハプテンを結合することがしばしば望ましいことがある。しかしながら、ヒドロキシル基、チオール、フェノール、イミダゾール、カルボキシル基等の他の基をs b p構成体に結合させてもよい。

【0044】酵素を含む蛋白質の、薬剤、蛋白質、ポリサッカライド、核酸等の種々の物質に対する接合は、文献中に広く例示を見出すことができる。種々の連結基および連結官能基が使用でき、また連結基の広い列挙は、米国特許第4,203,802号の37-43欄に与えられている。オキシカルボニル、ジアゾ、スルフォニル、オキシイミノ、イミドおよびチオノ官能基が都合よく使用できる。オキシカルボニルを用いると、還元的アルキレーションが有利に使用されるであろう。官能基間の連結基は、結合であってよく、しかしながら、より多くの場合少なくとも1個の炭素原子を有し、更に多くの場合、少なくとも2個の炭素原子を有し、かつ水素原子を除いて50個またはそれ以上の原子を有してもよい。酵素を蛋白質に接合させる方法は、米国特許第3,791,932号および第3,839,153号に見出され、また単一エピトープ性リガンド、すなわちハプテンの接合方法は、米国特許第3,817,837号の特に第31-34欄および実施例中に見出される。

【0045】酵素分子は、それに結合される少なくとも

1個のs b p構成体、好ましくは存在する触媒部位と少なくとも同数のs b p構成体、更に好ましくは触媒部位あたりに少なくとも3分子のs b p構成体が結合されるべきである。一般に、酵素の結合部位あたり、約1～10個のs b p構成体分子が存在するであろう。ここにおいて使用される「触媒部位」なる用語は、基質から生成物への変換の触媒作用が起こる酵素の活性部位を意味し、また「分子」なる用語は、分子および分子の残基の両者を含む。酵素は、共有的または非共有的にs b p構成体に結合されるが、好ましくは共有結合である。非共有的に結合される場合には、酵素は通常該酵素に対するレセプタに結合される。

【0046】阻害剤は、酵素に可逆的に結合し、酵素活性を調節、好ましくは阻害する。可逆的結合は、阻害剤の少なくとも酵素に結合する部分が、実質的な化学変化を伴わずに酵素から解離し得ることを意味する。以下の例は、本発明に有用な酵素阻害剤の単なる例示であって、限定を意図するものではない。

【0047】本発明の一実施態様において、阻害剤は、基質、遷移状態または生成物に構造的に類似し、酵素への結合について競合するであろう。このような阻害剤による競合は、酵素に結合する基質に干渉し、酵素活性の減少を生じるであろう。

【0048】別の実施態様において、阻害剤は酵素活性に影響を与えるエフェクター部位に結合し、このような阻害剤の酵素への結合は、酵素の触媒的性質を低減させる。

【0049】更に別の実施態様において、阻害剤は構造上、補因子様であって、酵素への結合について補因子と競合する。

【0050】また、更に別の実施態様において、阻害剤は酵素に対する抗体等のレセプタであり、酵素への結合によって酵素の立体配置を変化させるか、または基質が活性部位に接近することを立体的に阻止する。

【0051】好ましい阻害剤は、2000未満の分子量を有する。阻害剤は、酵素のs b p構成体への接合に関連して上述のように直接的にs b p構成体に共有的に接合してもよく、あるいは多くの阻害剤は、s b p構成体に共有的または非共有的に結合する中心分子に対して接合してもよい。中心分子は、デクストラン、ポリアクリレート、蛋白質、ポリサッカライド、オリゴヌクレオチド*



【0056】を有するデカメトニウムブロマイド；ならびに酵素西洋ワサビパーオキシダーゼ、および阻害剤ベンゾイルヒドロキサム酸等を含む。

【0057】本発明において特に興味あるものは、酵素β-ガラクトシダーゼの使用である。β-ガラクトシダーゼ-抗原接合体の活性は、低分子量の基質を使用した場合に抗-抗原抗体によってほとんど調節されない。基質が巨大分子に結合された場合に調節量は増加し得る

*ド等の天然または合成ポリマーであってよい。別法として、阻害剤は、s b p構成体に非共有的に結合してもよく、ここにおいて阻害剤は、通常はs b p構成体に対するレセプタに結合する。

【0052】一般的には、阻害剤の少なくとも1分子が接合されるs b p構成体の結合部位あたりに結合し、しばしば、阻害剤の少なくとも3個以上の分子がs b p構成体の結合部位あたりに結合する。一般に、s b p構成体の結合能力または安定性に妥協することなく、可能な限り多くの阻害剤を結合することが望ましい。通常、s b p構成体の結合部位あたり、約6～10またはそれ以上の阻害剤分子が結合される。ここにおいて使用される「結合部位」なる用語は、その相補的s b p構成体の結合が起こるs b p構成体の部位を意味する。分子量2000未満のハプテン等の低分子量s b p構成体との阻害剤の接合体も本発明の範囲内であるが、通常、阻害剤が結合するs b p構成体は、少なくとも10,000の分子量を有する。

【0053】s b p構成体に結合した場合に、阻害剤に結合された該s b p構成体が酵素に別法で結合されない限り阻害剤は酵素に対して $10^{-2} \sim 10^{-8} \text{ M}$ 、通常 $10^{-3} \sim 10^{-6} \text{ M}$ の範囲の解離定数をもって結合する。この場合、「別法で結合されない」なる用語は、阻害剤に結合するs b p構成体が、酵素、または酵素に結合されるs b p構成体に結合していないことを意味する。例えば、酵素が共有的に薬剤により標識され、かつ該薬剤に対する抗体が、酵素に対する阻害剤により共有的に標識されている場合に、該抗体は、該抗体に結合可能な遊離の薬剤の過剰量が、2種類の接合体を含む媒体中に含まれる場合に、酵素上の薬剤に別法で結合されない。通常、薬剤の過剰は、酵素に結合される薬剤に対して遊離の薬剤が少なくとも5倍、通常少なくとも10倍以上あることを示唆する。

【0054】本発明において、任意の酵素-阻害剤対が使用され得ることが予想される。このような対は、限定ではなく例示として：酵素グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、および例えば阻害剤補酵素A；酵素アセチルコリンエステラーゼ、および、例えば阻害剤として次の構造：

【0055】

【化1】

が、得られた大きい基質を使用するアッセイは、血清中の抗-β-ガラクトシダーゼ抗体により起こされる干渉と関連付けられる。それでもなお、β-ガラクトシダーゼは、血清成分の最小の干渉をもって血清中で高い感度で検出され得るため、アッセイで使用するには望ましい酵素である。かくして、本発明の好ましい実施態様は、好ましくは完全な免疫グロブリンである抗体とβ-ガラクトシダーゼの阻害剤との接合体、およびβ-ガラクト

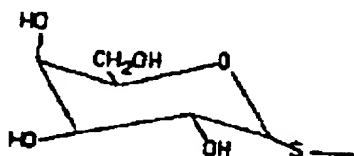
13

シダーゼと、抗体に相補的な分析対象物類似体との接合体を考慮する。該阻害剤は、競合的阻害剤であり得る。酵素基質が存在しない場合の阻害剤接合体の酵素に対する結合の解離定数、すなわち阻害定数 K_i は、該抗体が分析対象物類似体を実質的に別法で結合されていない場合に、通常 $10^{-2} \sim 10^{-8} M$ の範囲、好ましくは $10^{-3} \sim 10^{-8} M$ の範囲である。

【0058】 β -ガラクトシダーゼの共通する阻害剤は、多価水酸化ピペリジンおよび多価水酸化ピランからなる群から選択される化合物を含む。

【0059】阻害剤の一群は、構造式：

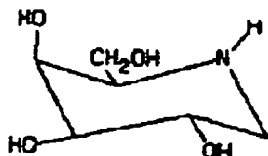
【化2】



【0060】を有するチオガラクトシドである。これらの阻害剤は、水素以外に1~50個の原子を有し、Sに結合する、ヒドロキシ、カルボキシル、ハライド、アミノ、マレイミド基、スルホン酸等のs b p構成体に結合するための官能基を含む結合基によってs b p構成体に結合される。これらの阻害剤は、一般に例えば ω -メルカプトカプロン酸等のメルカプタンと、テトラアセチル-1-クロロガラクトシド等の保護1-ハロガラクトシドとの反応により合成され得る。

【0061】阻害剤の第2の群は、 β -ガラクトシダーゼの既知の阻害剤である次の構造式：

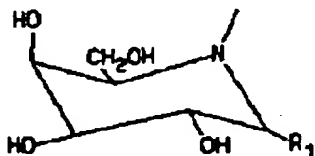
【化3】



を有する1-デオキシガラクトスタチンから誘導される。

【0062】誘導される β -ガラクトシダーゼ阻害剤は、次の構造式：

【化4】



【0063】を有し、式中 R_1 は、水素およびヒドロキシル(-OH)からなる群から選択される。これらの阻害剤は、水素以外に1~50個の原子を有し、Nに結合する、ヒドロキシ、カルボキシル、ハライド、アミノ、マレイミド基、スルホン酸等のs b p構成体に結合する

14

ための官能基を含む結合基によってs b p構成体に結合される。これらの β -ガラクトシダーゼに対する阻害剤は、一般に、1-デオキシガラクトスタチンを例えば ω -ハロ酸によりアルキル化して合成され得る。

【0064】チオガラクトシドおよびガラクトスタチン誘導阻害剤は、本発明で使用するために特異的結合対構成体に容易に結合され得る。例えば、その結合基にカルボキシルを有する阻害剤のN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルは、抗体のアミノ基で結合され得、あるいは、マレイミド基を有する阻害剤は、結合を容易にするために抗体上に導入されたスルフィドリル基にて結合され得る。

【0065】得られる阻害剤-抗体接合体は、該抗体に相補的な抗原のアッセイに使用される。例えば、阻害剤に接合されるテトラヒドロカンナビノール(THC)誘導体に対する抗体は、 β -ガラクトシダーゼとTHC誘導体との接合体と共に、THCまたはその代謝物のアッセイにおいて使用され得る。該アッセイにおいて、好ましくは試料と抗体接合体とが最初に合せられ、続いて酵素接合体および α -ニトロフェノール- β -ガラクトシド等の発色性酵素基質が添加されるが、場合により別の添加順序も使用され得る。測定可能な量の生成物が形成されるに十分な時間インキュベートした後に、生成物の量が試料中の分析対象物の量と関連して測定される。

【0066】分析対象物のアッセイは、通常水性の緩衝化媒体中、中程度のpH、一般的には至適なアッセイ感度を与えるpHにて行なわれる。

【0067】水性媒体は、水のみ、または0.01~40体積百分率の共溶媒を含んでもよい。該媒体のpHは、通常は4~11の範囲、より普通には約5~10の範囲、好ましくは約6.5~9.5の範囲である。pHは、特異的結合対および酵素および阻害剤の結合構成体の至適結合と、酵素活性検出のための至適pHとの妥協点である。

【0068】所望のpHを達成し、検出の間にpHを維持するために種々の緩衝剤が使用できる。例示的緩衝剤は、ホウ酸、リン酸、炭酸、トリス、バルビタール等を含む。使用される特定の緩衝剤は、本発明に対して臨界的なものではないが、個々のアッセイにおいてある緩衝剤が他のものより好ましいことはある。

【0069】アッセイの実施には通常中程度の温度が使用され、また測定の間、特に速度測定において通常は一定温度が使用される。インキュベーション温度は、通常約5°~45℃の範囲、より普通には約15°~45℃である。測定の間温度は、通常約10°~50℃の範囲、より普通には約15°~40℃の範囲である。

【0070】アッセイされる分析対象物の濃度は、約 $10^{-4} - 10^{-15} M$ 、より普通には約 $10^{-6} - 10^{-15} M$ にわたって変化する。アッセイが定性的、半定量的または定量的(試料中に存在する分析対象物の量に

相対的に) であるかについての考慮、特定の検出技術、および分析対象物の濃度が、一般に種々の試薬の濃度を決定するであろう。

【0071】アッセイ媒体中のs b p構成体を含む種々の試薬の濃度は、興味ある分析対象物の濃度範囲によって一般に決定されるが、これらの試薬のそれぞれの最終濃度は、アッセイの範囲にわたって感度を至適化すべく、通常は経験的に決定される。有意な分析対象物濃度の変化は、精確な測定可能な信号変化を与える。酵素基質の濃度は、アッセイの応答を最大にするよう選択され、通常少なくともKmと同程度、好ましくは該酵素のKmの2-10倍である。

【0072】添加の順序は種々変化し得るが、アッセイの性質に依存してある好適な順が存在するであろう。最も単純な添加順序は、すべての成分を同時に加え、典型的な均質アッセイにおけるものと同様に、アッセイ媒体の信号への影響を測定する。好ましくは、試薬は順次組合わされ、通常は試料と阻害剤とが、酵素および基質の添加に先立って組合わされる。場合により、インキュベーション工程を、1回以上の添加に続いて、一般に約5秒間〜3時間、更に普通には約30秒間から30分間にわたって含めてもよい。すべての試薬を、同時あるいは順次合せた後、信号が測定される。該信号は、試験される試料中の分析対象物の量に関連付けられる。

【0073】本発明の一実施態様において、試料中の分析対象物および分析対象物類似体-酵素接合体は、該分析対象物に対する抗体上の部位について競合し、阻害剤-抗体：分析対象物、および阻害剤-抗体：分析対象物類似体-酵素複合体を生じる。次いで、酵素の基質が添加される。該阻害剤-抗体：分析対象物類似体-酵素複合体中の酵素は、阻害剤の存在のために、基質の生成物への変換を、非効率的にしか触媒できない。しかしながら、未結合の分析対象物類似体-酵素接合体中の酵素は、その元来の触媒活性を保持している。酵素触媒反応は、例えば、発色性、発光性、蛍光性、電子発光性等の検出可能な生成物の形成を生じる。次いで、該媒体中の酵素活性が、通常分光光度測定法により測定され、既知量の分析対象物が存在する標準または対照試料が試験された場合に測定される酵素活性と比較される。典型的には、標準または対照試料は、分析対象物を含むと予想される試料と実質的に同様な方法で試験される。しばしば、未知試料の結果が、数個の標準試料のアッセイ結果と比較され得る。標準試料は、典型的には、測定されるべき分析対象物を既知であるが異なる濃度で含む。好ましくは、標準試料中に存在する濃度範囲は、未知試料中の予想される分析対象物濃度の範囲にわたる。

【0074】非競合アッセイの例は、2種類の抗体を含むサンドイッチアッセイであり、抗体のひとつは酵素により標識され、他方は該酵素の可逆的阻害剤で標識される。通常、2種類の抗体は水性媒体中の試料に合せら

れ、該混合物は、5秒間〜30分間インキュベートされ、次いで酵素基質が添加される。次いで生成物形成速度が測定され、試料に代えて標準溶液を用いて得られた速度を対照として、試料中の分析対象物の量と関連付けられる。

【0075】本発明を実施し得る多くの方法があり、下記の例は、単に例示的なものであって限定するものではない。

【0076】試料中の分析対象物がリガンドまたはレセプタである場合に本発明を実施する一方法は、リガンド類似体(L)に結合する酵素(E_z)であり得る試薬(E_z-L)を含む。第2の試薬(R-I)は、リガンドに対するレセプタ(R)に結合される酵素の阻害剤(I)であり得る。分析対象物がリガンドであるか、またはレセプタであるかに依存して、それは、R-IまたはE_z-Lにそれぞれ結合可能であり、従って、R-I接合体への結合についてE_z-Lと競合するか、あるいはその逆となる。試薬は、液体媒体中で、順次または同時に試料に添加され得る。酵素活性が減ぜられる下記の複合体が、試料中の分析対象物の量に反比例する量をもって形成される：

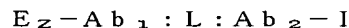


【0077】次いで、媒体の全活性が、試料中の分析対象物の量に関連付けられる。別法として、試薬は、レセプタに結合された酵素(E_z-R)およびリガンドに結合された阻害剤(L-I)であり得、アッセイにおいて複合体：



を形成し、ここにおいて酵素活性は同様に減ぜられ、また試料中の分析対象物の量に反比例的に関連する量をもって見出される。

【0078】試料中の分析対象物が、多価エピトープ性リガンド(L)である場合の、本発明を実施する別の方法では、ひとつの試薬はリガンドに対する第1の抗体(A b₁)に結合する酵素(E_z)であり得る。第2の試薬は、第1の抗体とは異なるエピトープに結合する、リガンドに対する第2の抗体(A b₂)に結合する、酵素に対する阻害剤であり得る。該試薬は、水性媒体中において試料と順次または同時に合せられる。この非競合的アッセイは、複合体：



を生じ、ここで該酵素活性は低減されている。媒体の酵素活性は、試料中の分析対象物の量に直接に関連付けられる。

【0079】試料中の分析対象物がリガンドまたはレセプタである場合の、本発明を実施する更に別の方法では、ひとつの試薬はリガンド類似体(L)に結合する酵素であり、第2の試薬はリガンドに対するレセプタ(R)であり得、ここで該リガンド-レセプタ対の構成体のひとつが分析対象物に結合し得る。第3の試薬は、

該レセプタに相補的な $s b p$ 構成体に結合する、酵素に対する阻害剤 (I) であり得る。分析対象物は、レセプタに対する E_z-L 接合体の結合について競合し、そしてレセプタは $s b p-I$ 接合体に結合される。該試薬は、試料を含む水性媒体に、順次または同時に添加され得る。分析対象物が存在しない場合、複合体 $E_z-L : R : s b p-I$ が形成され、ここにおいて酵素活性は低減されている。しかして、存在する分析対象物の量に比例して未結合酵素量が増大し、試薬の混合に続いて測定される酵素活性が、対応して増大するであろう。

【0080】別法として、第1の試薬は上述した E_z-L 接合体であり得、第2の試薬は第1の $s b p$ 構成体 ($s b p_1$) に結合するリガンドに対するレセプタであり得、また第3の試薬は第1の $s b p$ 構成体 ($s b p_1$) に相補的な $s b p$ 構成体 ($s b p_2$) に結合する阻害剤であり得、複合体：

$E_z-L : R-s b p_1 : s b p_2-I$
を生じる。

【0081】この後者の例において、 $s b p_1$ または $s b p_2$ は、好ましくは、分子量100-2000、好ましくは150-1000を有し、レセプタが存在するか調製され得る小分子または小分子の残基である。このような小分子の例は、ビオチン、リゼルギン酸、フルオレセインおよびビタミン B_{12} の誘導体をを含み、ここで対応するレセプタはそれぞれアビジン、抗-リゼルギン酸、抗-フルオレセインおよび内因子である。

【0082】試料中の分析対象物がリガンドまたはレセプタである場合の、本発明を実施する更に別の方法において、第1の試薬は第1の $s b p$ 構成体 ($s b p_1$) に結合する酵素 (E_z) であり得、第2の試薬は、リガンド類似体 (L) に結合する第2の $s b p$ 構成体 ($s b p_2$) であり得、ここにおいて $s b p_1$ は $s b p_2$ に相補的である。第3の試薬は、リガンドに対するレセプタ (R) に結合する、酵素に対する阻害剤 (I) であり得、ここでリガンド-レセプタ対の構成体のひとつが分析対象物に結合し得る。分析対象物は、レセプタに対する $s b p_2-L$ 接合体の結合と競合し、また $s b p_2-L$ 接合体は $E_z-s b p_1$ 接合体に結合する。該試薬は、試料を含む水性媒体に、順次または同時に添加され得る。分析対象物が不在である場合に、複合体、 $E_z-s b p_1 : s b p_2-L : R-I$ が形成され、ここでは酵素活性が低減されている。かくして、存在する分析対象物の量に比例的に未結合酵素の量が増大し、試薬の混合に続いて測定される酵素活性が対応して増大するであろう。 $s b p$ 構成体は、好ましくは上記に定義された小分子である。

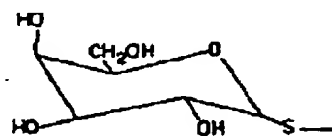
【0083】本発明の別の実施態様は、分析対象物を含むと予想される試料中の分析対象物の存在を測定するためのアッセイに関するもので：試料、酵素と分析対象物類似体との第1の接合体、および酵素に対する阻害剤と

分析対象物に対する抗体との第2の接合体を水性媒体中に合せ、ここにおいて第1の接合体に対する第2の接合体の結合が、該媒体中の分析対象物の存在によって調節され；ならびに該媒体の酵素活性を測定することを含む。

【0084】この発明は、成分の組成物も意図するものである。ひとつの組成物は、酵素に結合する抗原、および該酵素に対する可逆的阻害剤に結合する該抗原に対する抗体の溶液を含んでなる。他の組成物は、酵素に共有的に結合する抗原、および阻害剤に共有的に結合する抗体を含有する溶液を含んでなる。別の組成物は、酵素に共有的に結合する分子量2000未満の薬剤、および該酵素に対する通常競合的である阻害剤に共有的に結合する該薬剤に対する抗体の溶液を含んでなる。本発明による別の組成物は、免疫グロブリンと β -ガラクトシダーゼの通常は競合的である阻害剤との接合体を含み、ここで該接合体は、酵素基質が存在しない場合に $10^{-2}-10^{-8}M$ の範囲、好ましくは $10^{-3}-10^{-10}M$ の範囲の解離定数をもって β -ガラクトシダーゼに結合する。このような組成物のひとつは、免疫グロブリンと阻害剤との接合体を含み、ここで該阻害剤は構造：

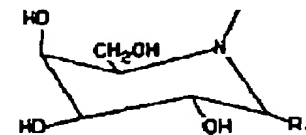
【0085】

【化5】



【0086】または構造：

【化6】



【0087】を含み、式中 R_1 は、水素およびヒドロキシルからなる群から選択される。別の組成物は、免疫グロブリンの結合部位あたり、少なくとも3個の阻害剤分子が結合する接合体を含んでなる。好ましい組成物は、薬剤がジゴキシンまたはシクロスポリンであるものである。

【0088】また、本発明は、包装形態において、第1の $s b p$ 構成体と酵素との第1の接合体、および第2の $s b p$ 構成体と前記酵素に対する阻害剤との第2の接合体を含んでなる分析対象物の免疫アッセイ実施用キットを含む。本発明の多面的機能を向上するために、試薬類はそれらの割合が本方法およびアッセイの実質的な至適化を与えるように、同一または別個の容器中にて包装形態をもって提供され得る。試薬類は、交差反応性および安定性に依りて、それぞれ個々の容器をもって、または

種々の試薬を組合わせて1個以上の容器をもって与えられてもよい。便利のため、本発明にて使用されるは、あらかじめ定められた量をもって提供され得る。試薬類は、上述したようにs b p構成体-酵素およびs b p構成体-阻害剤接合体を含み、更に酵素基質等の信号生成系構成体、補因子、標準、補助的試薬等を含むアッセイ実施のための他の包装された試薬を含むことができる。

【0089】種々の試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に至適化する試薬溶液濃度を与えるために、広範囲で変化され得る。試薬類は、賦形剤を含め、溶解によってアッセイを行なうために適切な濃度の試薬溶液が与えられる、通常は凍結乾燥された乾燥粉末として提供されてもよい。

【0090】本発明により考慮されるキットのひとつは、第1の試薬として酵素に結合された抗原、および第2の試薬として酵素に対する可逆的阻害剤に結合された抗原を含む。別のキットは、第1の試薬として酵素に共有的に結合された2000未満の分子量を有する薬剤、および第2の試薬として酵素に対する通常は競合的である阻害剤に共有的に結合された該薬剤に対する抗体を含む。本発明による別のキットは、第1の試薬としてβ-ガラクトシダーゼに結合される分子量2000未満の薬剤、および第2の試薬としてβ-ガラクトシダーゼに対する阻害剤に結合される該薬剤に対する抗体を含む。別のキットは、免疫グロブリンとβ-ガラクトシダーゼの阻害剤との接合体を含み、ここにおいて該接合体は、酵素基質が存在しない場合に、 10^{-2} - 10^{-8} Mの範囲の解離定数をもってβ-ガラクトシダーゼに結合する。本発明は、免疫グロブリンとβ-ガラクトシダーゼの阻害剤との接合体を含むキットをも提供するもので、該接合体は酵素基質が存在しない場合に 10^{-2} - 10^{-8} Mの範囲の解離定数をもってβ-ガラクトシダーゼに結合し、また該接合体は、免疫グロブリンの結合部位あたり、少なくとも3個の阻害剤分子が結合する。

【0091】先の記述中で参照した特許および特許出願を、それらの全体についてここに参考として組入れる。

【実施例】

【0092】本発明は、限定ではなく、例示のために示される以下の例によって更に例示される。別途示さない限りすべての温度はセ氏で示してある。体積で示され

る液体の混合物を除いて、別途示さない限り全ての百分率および割合は重量により示した。別途示さない限り、使用した種々の試薬は商業的に入手可能である。以下の略号は示された意味を有する：

【0093】AcOH - 酢酸

BMW - ブタノール：MeOH：トルエン：H₂O, 2：1. 25：1：1

DCC - 1, 3-ジクロロヘキシルカルボジイミド

10 DMF - ジメチルホルムアミド

DMSO - ジメチルスルホキシド

DTE - ジチオエリスリトール

EDAC - 1- (3-ジメチルアミノプロピル) - 3-エチルカルボジイミドハイドロクロライド

EDTA - エチレンジアミンテトラ酢酸

EGTA - エチレングリコール-ビス (β-アミノエチルエーテル) N, N, N', N' - テトラ酢酸

EtOH - エタノール

Et₂O - ジエチルエーテル

20 Et₃N - トリエチルアミン

Et₃SiH - トリエチルシラン

IPTG - イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド

MeOH - メタノール

MES - 2- (N-モルホリノ) エタンスルホン酸

NHS - N-ヒドロキシスクシンイミド

ONPG - o-ニトロフェノールガラクトシド

PTLC - 調製用TLC

30 Rf - 保持係数

tBoc - t-ブトキシカルボニル

TFA - トリフルオロ酢酸

TLC - 薄層クロマトグラフィ

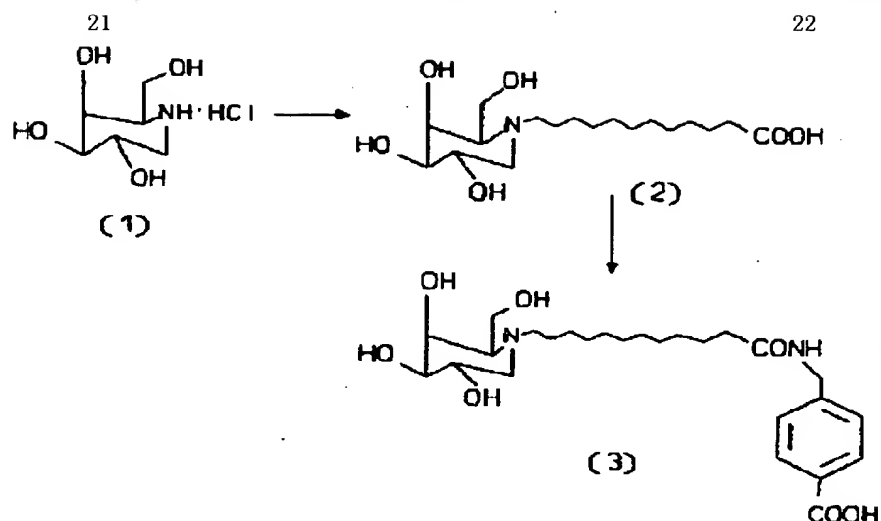
TMS - トリメチルシリル

【0094】例 1

アミン-反応性デオキシガラクトスタチン阻害剤の調製
アミン-反応性デオキシガラクトスタチン阻害剤 (3)

の調製は、次のように概略が示される：

【化7】



【0095】1-ブロモドデカン酸 (600mg、2.1mmol) および K_2CO_3 (~250mg) を、アセトン：水 (6：4、15ml) 中の1-デオキシガラクトスタチン (1) (100mg、0.5mmol)

(Bernotasら、Carbohydrate Research、167：305 (1987) 参照) 溶液に加えて、pHを8-9に調節した。 NaI (数個の結晶) の添加後、該反応混合物をアルゴン下にて55℃で48時間加熱した。得られた乳状懸濁物を濃縮し、遠心分離した。上清をBiorad AG 1-X-4 (OH⁻) (12×2cm) に負荷し、 H_2O (500ml) にて洗浄して原料を回収した (25mg、25%)。生成物 (2) をAcOH (200ml、2M) によって純粋化合物として溶出させた。収率：75mg、40%

【0096】N-ヒドロキシスクシンイミド (150mg) およびEDAC (150mg) を、DMF (10m

l) 中の化合物 (2) (120mg) の溶液に添加した。該反応混合物をアルゴン下にて一夜攪拌し、次いでトリエチルアミン (800μl) およびDMF (10ml) 中の4-(アミノメチル) 安息香酸 (400mg) の懸濁物に加えた。0.5時間後に該反応を終了し、該混合物を0.1N HClにより酸性化し、蒸発乾燥させた。アミン-反応性デオキシガラクトスタチン阻害剤 (3) を調製用TLC (溶出液：BMW) により精製した。生成物に対応するバンドの抽出を、MeOH、次いでエタノールを用いて行なった。収量：78mg

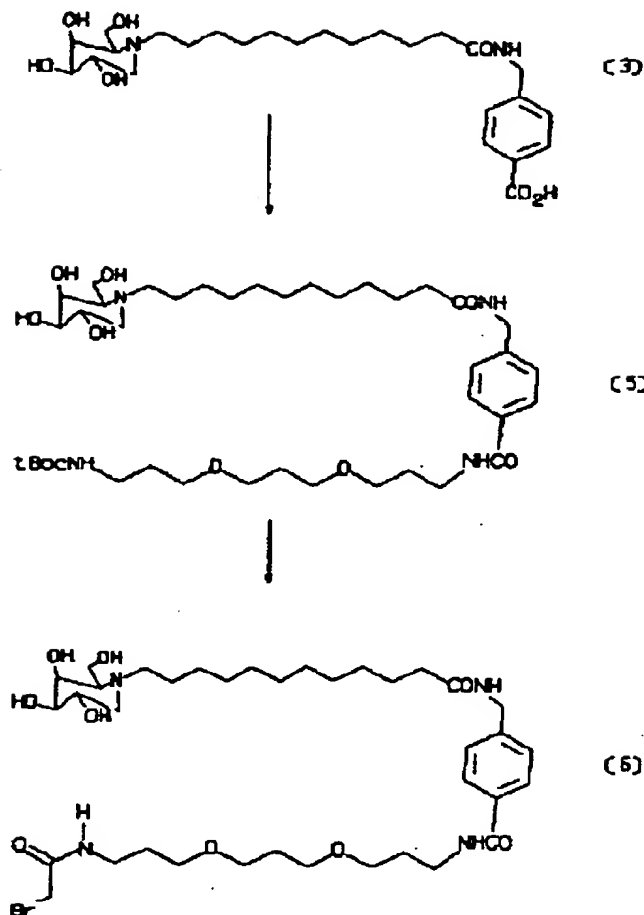
【0097】例 2

チオール-反応性デオキシガラクトスタチン阻害剤の調製

チオール-反応性デオキシガラクトスタチン阻害剤

(6) の調製は、次のように概略が示される：

【化8】



【0098】ジオキサドデカンジアミンを、1, 6-ヘキサジアミンについて J. B. Hansen らの Synthesis 404 (1982) に報告されている方法に従ってモノ-tert-ブチルオキシカルボキシル化した。

【0099】DMF (4 ml) 中の化合物 (3) (25*

*mg) を、NHS (27 mg) および EDAC (110 mg) を用いて、アルゴン下に室温にて16時間処理した。得られた混合物をアミン (4) (76 mg) :

【化9】



(4)

【0100】の、トリエチルアミン (27 μl) を含む DMF (250 μl) 中の溶液に添加した。30分後、該反応混合物を HCl (0.1 N) により中和し、蒸発乾燥させ、生成物を調製用 TLC (溶出液: BMW) により精製した。主バンドの MeOH、次いで EtOH による抽出で、所望の生成物 (5) を得た。収量: 18 mg

【0101】化合物 (5) (14 mg) を TFA (0.5 ml) により15分間処理した。次いでメタノールを添加し、該溶液を蒸発乾燥させた。残渣を DMF (1 m

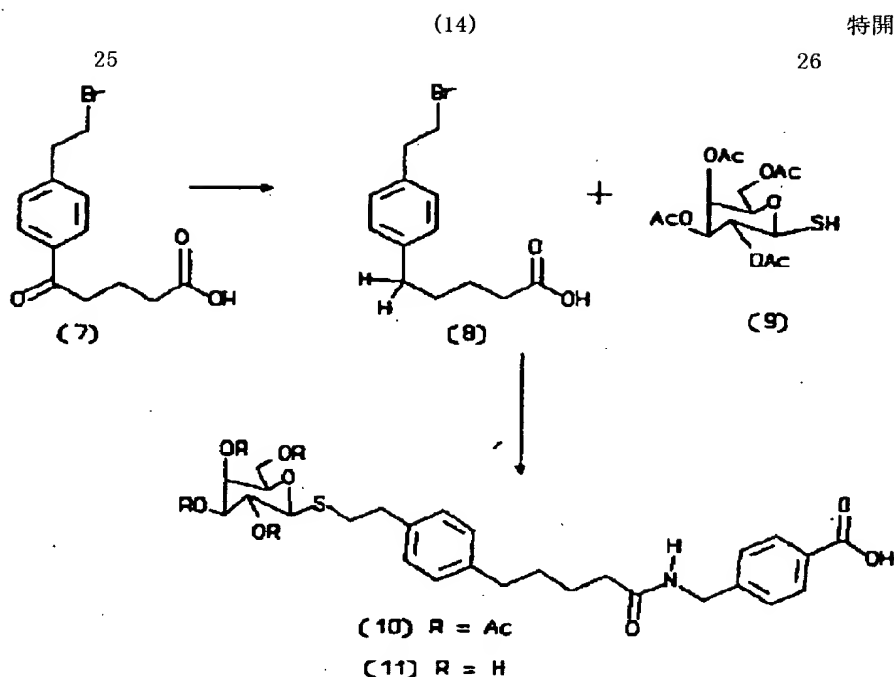
l) に溶解させ、Et₃N を用いて pH 8-9 に塩基性化させた。プロモ酢酸-NHS エステル (9 mg) を添加し、該混合物をアルゴン下に1時間保持し、次いで蒸発乾燥させた。生成物 (6) を調製用 TLC (溶出液: BMW) により精製した。収量: 8 mg

【0102】例 3

アミン-反応性チオガラクトシド阻害剤の調製

アミン-反応性チオガラクトシド阻害剤 (11) の調製は、次のように概略が示される:

【化10】



【0103】フェニルエチルブロマイド (370 μ l、2.7 mmol) および無水グルタル酸 (615 mg、5.39 mmol) を、 CH_2Cl_2 (20 ml) 中、アルゴン下で氷浴の温度まで冷却した。アルミニウムジクロライド (1.4 g) を添加し、1分後に浴を除いた。30分後に溶液は赤色 (黄色からオレンジ色を経て) になった。 H_2O (50 ml) を加え、pHを1 N HClによりpH2-3まで低下させた。赤色が消え、該混合物を CH_2Cl_2 (3 \times 100 ml) により抽出した。次いで、合せられた有機分を水性 NaHCO_3 (3 \times 100 ml) により抽出し、水性抽出物を1 N HClによりpH2に酸性化した。 CH_2Cl_2 (3 \times 50 ml) による抽出、乾燥 (MgSO_4)、および溶媒の蒸発によってオレンジ色の残渣を得、これを調製用TLC (4% MeOH- CH_2Cl_2 、AcOH/200 mlあたり30滴) につけ、純粋生成物 (7) を得た。収量: 605 mg

【0104】 Et_3SiH (133 μ l、0.835 mmol) を、TFA (254 μ l、3.3 mmol) 中の臭化物 (7) (100 mg) の溶液に添加した。室温にて18時間後、メタノールを加え、反応混合物を蒸発乾燥させた。 CH_2Cl_2 - Et_2O -ヘキサンからの結晶化により純粋化合物 (8) を得た。収量: 80 mg

【0105】 H_2O (3 ml) および K_2CO_3 (144 mg) を、アセトン (5 ml) 中の2, 3, 4, 6-テトラ-O-アセチル-1-チオ- β -D-ガラクトピラノース (9) (M. Cerneyら、Monats h. 94:290 (1963) 参照) (178 mg) および (8) (100 mg) の溶液に添加した。3時間後、 H_2O (20 ml) を加え、溶液を1 N HClによってpH2に酸性化した。アセトンを留去後、該混合物を CH_2Cl_2 (5 \times 20 ml) で抽出した。合せられた有機分を乾燥させ (Na_2SO_4)、蒸発乾燥させ

た。更に精製することなく、該残渣をDMF (5 ml) に溶解させ、NHS (120 mg、1.05 mmol) およびEDAC (267 mg、1.4 mmol) を用いて18時間処理した。次いで、該混合物を、 Et_3N (600 μ l) を含むDMF (2 ml) 中の4-(アミノメチル)安息香酸 (370 mg) の懸濁物に加えた。30分後に H_2O (50 ml) を加え、次いで該混合物を1 N HClによりpH2に酸性化し、 Et_2O (5 \times 50 ml) により抽出した。合せられた有機分を飽和食塩水で洗浄し、乾燥させ (Na_2SO_4)、蒸発乾燥させた。化合物 (10) を調製用TLC (2% MeOH- CH_2Cl_2 、AcOH/200 mlあたり30滴) により精製した。収量: 147 mg

【0106】化合物 (10) (100 mg) をMeOH (10 ml) に溶解させ、 MeONa (38 mg) を加えた。30分後、反応混合物が中性となるまでAmbelite IRC50 (H^+) を加えた。次いで、該混合物をろ過し、樹脂状物をMeOHで洗浄した。合せられた洗浄液を濃縮し、 CH_2Cl_2 の添加により化合物 (11) を沈殿させた。収量: 60 mg

【0107】例 4
ポリクローナル抗-ジゴキシン抗体 (R1273) の精製

Affigel-ouabainのカラム (4 cm \times 2 cm; 15 mlゲル) を緩衝溶液 (0.02 Mリン酸ナトリウム、0.15 M NaCl、pH7.3) によって平衡化した。粗製R1273 (35 ml) を加え、溶出液を3回カラムに通し、次いで緩衝溶液A (200 ml) により洗浄した。次いで、ポリクローナル抗体を、同じ緩衝溶液中のウアバイン (ouabain) の10 mg/mlの溶液で溶出し、23の分画を集めた。3-13の分画は、ゲル電気泳動により同等であることが示され、貯留して (42 ml)、接合実験に使用した。分

画14-22 (40ml) は、別に保存した。

【0108】例 5

精製ポリクローナル抗-ジゴキシン抗体 (R1273) の還元およびアルキル化

アフィニティ精製されたR1273抗体の溶液 (2.35mg/ml、10ml) を、 Na_2HPO_4 溶液 (0.2M) によりpHを8に調節し、EDTA (38mg) を加えた。アルゴン下に2時間置いた後、DTE (15mg) を加え、該反応混合物をアルゴン下に5時間保持した。次いで、アイオドアセトアミド (55mg) を加え、更に1時間後に該反応物を、緩衝溶液 (4×2.5リットル; 0.1Mリン酸ナトリウム、0.2M塩化ナトリウム、pH8) に対して透析した。還元され、アルキル化された抗体R1273を、更に使用するまで、低温室に保存した。

【0109】例 6

抗-ジゴキシン抗体の阻害剤による無作為的標識

NHS (1mg、9.7μmol) およびEDAC (3mg、16μmol) を、化合物 (3) (2.4mg、4.87μmol) の溶液に加えた。アルゴン下で室温にて16時間後、NHSエステル形成は、95%以上が完結していた (TLC、系: BMW)。1mlの緩衝溶液 (0.1Mリン酸ナトリウム、0.2M塩化ナトリウム、pH8) 中の還元、アルキル化R1273抗体 (1mg) を、ウアバイン (10mg) と共に室温にて1時間インキュベートした。該阻害剤溶液 (20当量~900eq/eq抗体) を、次いで抗体に加え、該反応混合物を室温にて静置した。2時間後、該混合物を、透析前に $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (3mg) により2℃にて一夜処理するか、あるいは直接に緩衝溶液 (3×2.5リットル; 0.1Mリン酸ナトリウム、0.2M塩化ナトリウム、pH7.5) に対して透析した。該接合体溶液を、遠心分離にかけ、使用するまで2℃で保存した。

【0110】この方法を、以下についての標識に用いた: 還元およびアルキル化モノクローナル抗-シクロスポリン抗体、還元およびアルキル化モノクローナル抗-ジゴキシン抗体、アフィニティ精製ポリクローナル抗-ジゴキシン抗体、および、天然アフィニティ精製ポリクローナル抗-ジゴキシン抗体。還元およびアルキル化アフィニティ精製ポリクローナル抗-ジゴキシン抗体を、同様の方法によってチオグラクトシド阻害剤で標識した。

【0111】例 7

ビス-β-アラニンジゴキシンNHSエステルの合成

ジゴキシン (2g) を、DMF (20ml)、メタノール (14ml) および水 (14ml) の混合物に溶解させ、水 (10ml) とメタノール (10ml) との混合物中の過ヨウ素酸ナトリウム (1.434g) の溶液によって滴下処理した。該溶液を室温にて3時間、次いで4℃にて2日間攪拌した。該反応混合物を水にて希釈

し、酢酸エチルで抽出した。合せられた抽出物を飽和食塩水で洗浄し、乾燥させ、蒸発させてジゴキシンジアルデヒドを油状白色固形物 (2g) として得た。

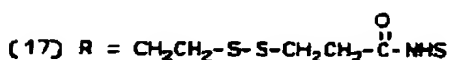
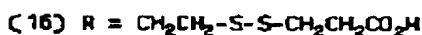
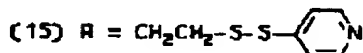
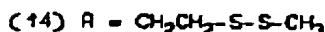
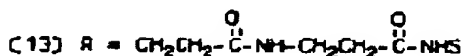
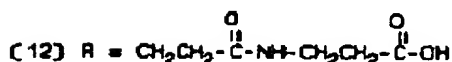
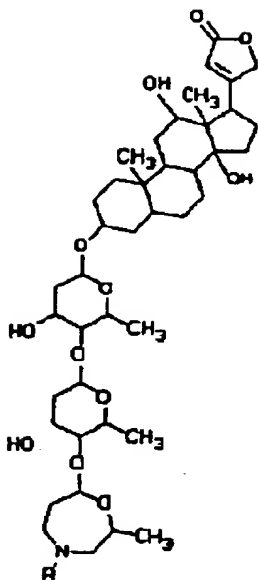
【0112】ビス-β-アラニン (98mg) およびナトリウムシアノボロハイドライド (40mg) を、0.3M AcOHに溶解させ、メタノール (6ml) 中のジゴキシンジアルデヒド (390mg) の溶液に添加した。3時間後、該反応混合物を蒸発乾燥させ、クロマトグラフィーにかけてビス-β-アラニンジゴキシン (12) (295mg) を得た。

【0113】ビス-β-アラニンジゴキシン (89mg) を、DMF (1ml) 中に溶解させ、NHS (17mg) およびEDAC (24mg) と室温にて16時間反応させ、ビス-β-アラニンジゴキシンNHSエステル (13) を得た。化合物 (12) および (13) は、以下の構造を有している。

【0114】

【化11】

29



【0115】例 8

ビス-β-アラニンジゴキシンのβ-ガラクトシダーゼのアミンに対する接合

E. coli のβ-ガラクトシダーゼ (14.7 mg) を、アルゴンにより脱気した2.7 mlの緩衝溶液 (0.1 Mリン酸ナトリウム、1.2 mM塩化マグネシウム、pH 7.6) に溶解させた。この溶液2.6 mlを、プロモ酢酸 (同緩衝溶液中の0.4 M溶液0.9 ml) により処理した。該溶液を室温にて4時間インキュベートし、次いで過剰量の試薬を透析して除いてカルボキシメチル化ガラクトシダーゼ (3.6 mg/ml) を得た。

【0116】0.2 mlの緩衝溶液 (10 mMリン酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム、1.0 mM塩化ナトリウム、pH 7.1) に溶解させたカルボキシメチル化ガラクトシダーゼ (0.72 mg) を、イソプロピル-β-ガラクトピラノシドの10 mg/ml H₂O

30

溶液22 μlおよびビス-β-アラニンジゴキシンNHSEステル (13) (DMF中の100 mM溶液4 μl) を用いて処理した。得られた溶液を、4時間インキュベートした。過剰量の試薬を透析により除去し、アミノ-標識ジゴキシン-ガラクトシダーゼ接合体を得た (0.74 mg/ml)。

【0117】例 9

ジゴキシン ジスルフィドアフィニティ標識の合成

ジゴキシンジアルデヒド (3.02 g) をメタノール

(75 ml) 中に溶解させた。2-メチルジチオエチルアミン (1.0 g) およびナトリウムシアノボロハイドライド (700 mg) を添加し、次いで1.0 Mの酢酸緩衝溶液 pH 4.5 (4 ml) を加えた。得られた溶液を室温にて40分間攪拌し、次いで水により希釈し、酢酸エチルにて抽出した。該抽出物を乾燥させ、蒸発させ、クロマトグラフィーにかけてジゴキシンメチルジスルフィド (14) (1.87 g) を得た。

【0118】ジゴキシンメチルジスルフィド (14)

(412 mg) を、脱気した10%水性メタノール (5 ml) に溶解させ、DTE (70 mg) およびトリエチルアミン (12 μl) により処理し、2時間静置した。次いで溶媒を蒸発させ、残渣をTHF (6 ml) に溶解させ、ジピリジルジスルフィド (106 mg) にて処理した。得られた溶液を室温にて30分間攪拌し、次いで酢酸エチルで希釈し、重炭酸ナトリウムの希釈水溶液、水および飽和食塩水により抽出した。酢酸エチル溶液を乾燥させ、蒸発させ、残渣をクロマトグラフィーにかけてジゴキシンプリジルジスルフィド (15) (228 mg) を得た。

30 【0119】ジゴキシンプリジルジスルフィド (15)

(228 mg) および2-メルカプトプロピオン酸 (22 μl) を、THF (6 ml) に溶解させ、室温にて30分間攪拌した。2-メルカプトプロピオン酸の少量の追加 (1 μl) を加え、溶液を濃縮した。残渣をクロマトグラフィーにかけて、ジゴキシンジスルフィド酸 (16) を得た。

【0120】ジゴキシンジスルフィド酸 (16) (3.0 mg) を、0.2 mlのDMF中のEDAC (8 μmol) およびNHS (17.7 μmol) の溶液により処理した。2時間後に追加のEDAC (8 μmol) およびNHS (17.7 μmol) をDMF (100 μl) に溶解して加え、該溶液を一夜攪拌した。DMF (20 μl) に溶解した追加のEDAC (1.6 μmol) およびNHS (3.5 μmol) を加え、該混合物を更に5時間保持し、DMF中のジゴキシンジスルフィドNHSアフィニティ標識 (17) (10.1 mM) の溶液を得た。

【0121】例 10

モノクローナル抗-ジゴキシン抗体の還元およびアルキル化

1. 6 mlの第2の緩衝溶液 (0.1 Mリン酸ナトリウム、0.2 M塩化ナトリウム、10 mM EDTA、pH 7.4) と混合された2.0 mlの緩衝溶液 (20 mMリン酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム、pH 7.4) 中の、モノクローナル抗-ジゴキシン抗体 (37.6 mg) を、400 μ lのDTE (直前の緩衝溶液中の0.1 M) により処理した。該溶液の室温における5時間のインキュベーション後、水 (0.44 ml) 中のアイオドアセタミド (24.2 mg) の溶液を添加し、該溶液を室温にて1時間インキュベートした。過剰量の試薬を透析により除去して還元されアルキル化モノクローナル抗-ジゴキシン抗体 (7.8 mg/ml) の溶液を得た。

【0122】例11

モノクローナル抗-ジゴキシン抗体のジゴキシンジスルフィドアフィニティ標識によるアフィニティ標識

3.0 mlの緩衝溶液 (0.01 Mリン酸ナトリウム、0.15 M塩化ナトリウム、pH 7.0) 中の還元、アルキル化モノクローナル抗-ジゴキシン抗体 (23.4 mg) を、DMF (85 μ l) 中のジゴキシンジスルフィドNHSエステルアフィニティ標識 (17) (0.86 μ mol) の溶液によって処理した。得られた溶液を室温にて3.5時間撹拌した。過剰量の試薬を透析により除去し、アフィニティ標識モノクローナル抗-ジゴキシン抗体の溶液を得た (6.8 mg/ml)。

【0123】例12

チオール抗体への阻害剤の結合

0.8 mlの緩衝溶液 (10 mMリン酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム、pH 7.3) に溶解されたアフィニティ標識モノクローナル抗-ジゴキシン抗体 (5.4 mg) を、DMF中のジゴキシン溶液 (10 mg/ml) 50 μ l、10 μ lのDMFと混合し、緩衝溶液 (0.2 M塩化ナトリウム、0.1 Mリン酸ナトリウム、0.01 M EDTA、pH 7.8) 中のDTE (25 mM) の溶液100 μ lにより、更には40 μ lの緩衝溶液により処理した。該溶液を室温にて4.5時間インキュベートした。得られた溶液の一部 (520 μ l) を、チオール反応性デオキシガラクトスタチン阻害剤 (6) (50:37のメタノール:水混合物中の75 mM溶液80 μ l) により処理し、該溶液を一夜静置した。次いで、該溶液を、150 mM塩化ナトリウム、10 mMリン酸ナトリウム、pH 7.3の緩衝溶液に対して透析し、0.20 μ のフィルタを通してろ過し、同じ緩衝溶液に対して再透析して、アフィニティ標識阻害剤-抗体接合体 (0.57 mg/ml) の溶液を得た。

【0124】例13

結合部位からのジゴキシンの除去

例12のアフィニティ標識阻害剤-抗体接合体 (1.0 ml中に0.57 mg) を、少量のトリチウム化ジゴ

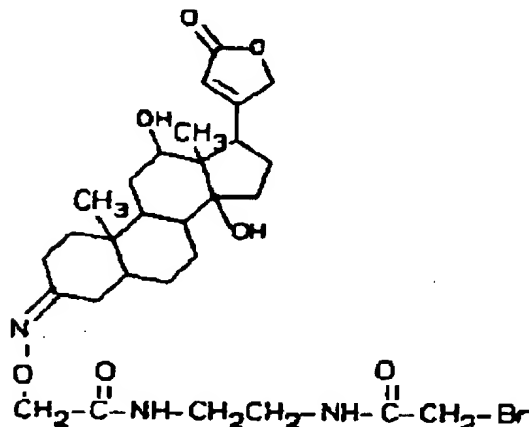
キシンと混合し、500 mlの10 mM MES緩衝溶液 pH 5.8 に対して透析し、次いでスラリー形態にてABXレジン (J. T. Baker Co.) の1 mlに吸着させ、カラムに負荷した。該カラムを400 mlの10 mg/mlウアバインにより4日間で、すべてのジゴキシンが除去されたことが判断される (カラム溶離液の放射能の監視による) 時点まで洗浄した。該カラムを過剰のウアバインを除去するために10 mM MESで洗浄し、次いで抗体の溶出のために0.2 M塩化ナトリウム、0.1 Mリン酸ナトリウム、pH 7にて洗浄した。全量で0.28 mgの標識抗体が回収された。

【0125】例14

β -ガラクトシダーゼのチオールに対するジゴキシンの接合

アルゴン脱気した0.1 Mリン酸ナトリウム、1 mM塩化マグネシウム、pH 8の緩衝溶液中の β -ガラクトシダーゼ (200 μ l、3.6 mg/ml) の溶液を、22 μ lのIPTG (上記緩衝溶液中に10 mM)、および4.5 μ l (DMF中37 mM) のプロモアセチルジゴキシン誘導体:

【化12】

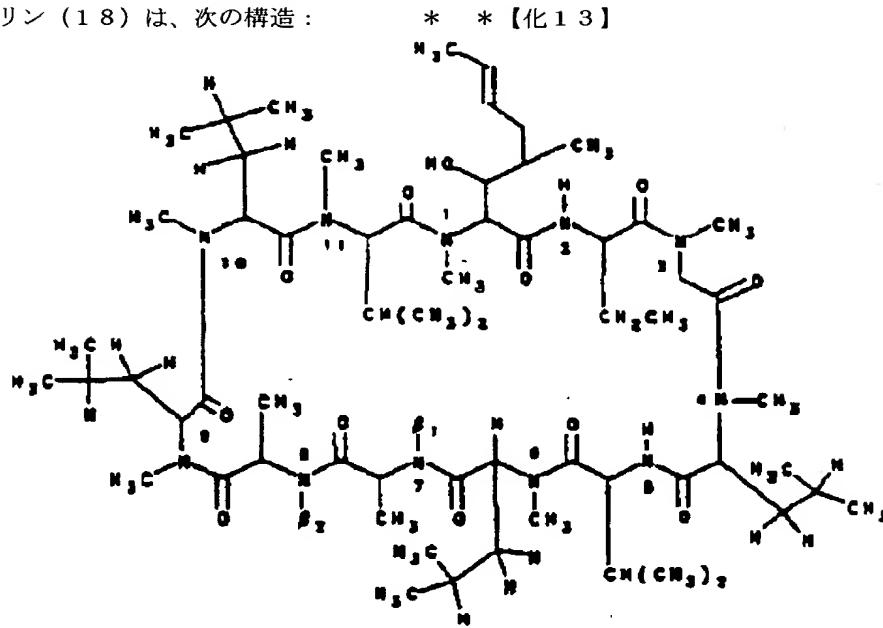


【0126】により順次処理した。得られた溶液を室温にて4時間インキュベートした。該溶液を10 mMリン酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム、1 mM塩化マグネシウム、pH 7.4の緩衝溶液に対して透析し、次いでpH 9、100 mMホウ酸ナトリウム緩衝溶液中の β -メルカプトエタノールの0.4 M溶液150 μ lにて6時間処理した。過剰量の試薬を、10 mMリン酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム、1 mM塩化マグネシウム、pH 7.4の緩衝溶液に対して透析することにより除去した。得られた溶液のpHを、0.1 N NaOHにより9.5に調節し、10 μ lの β -メルカプトエタノールを加えた。該混合物を室温にて一夜インキュベートし、透析して過剰量の試薬を除去してジゴキシン-ガラクトシダーゼ接合体を得た。

【0127】例15

プロモアセチルシクロスポリンの調製

化合物シクロスポリン (18) は、次の構造：

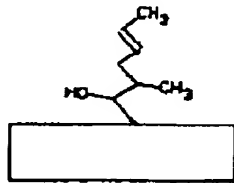


(18)

を有し、ここにおいて β_1 および β_2 は、それぞれ第7および第8のアミノ酸残基に結合する水素または結合基である。

【0128】以下の例のために、シクロスポリン構造は、次のように略記され：

【化14】

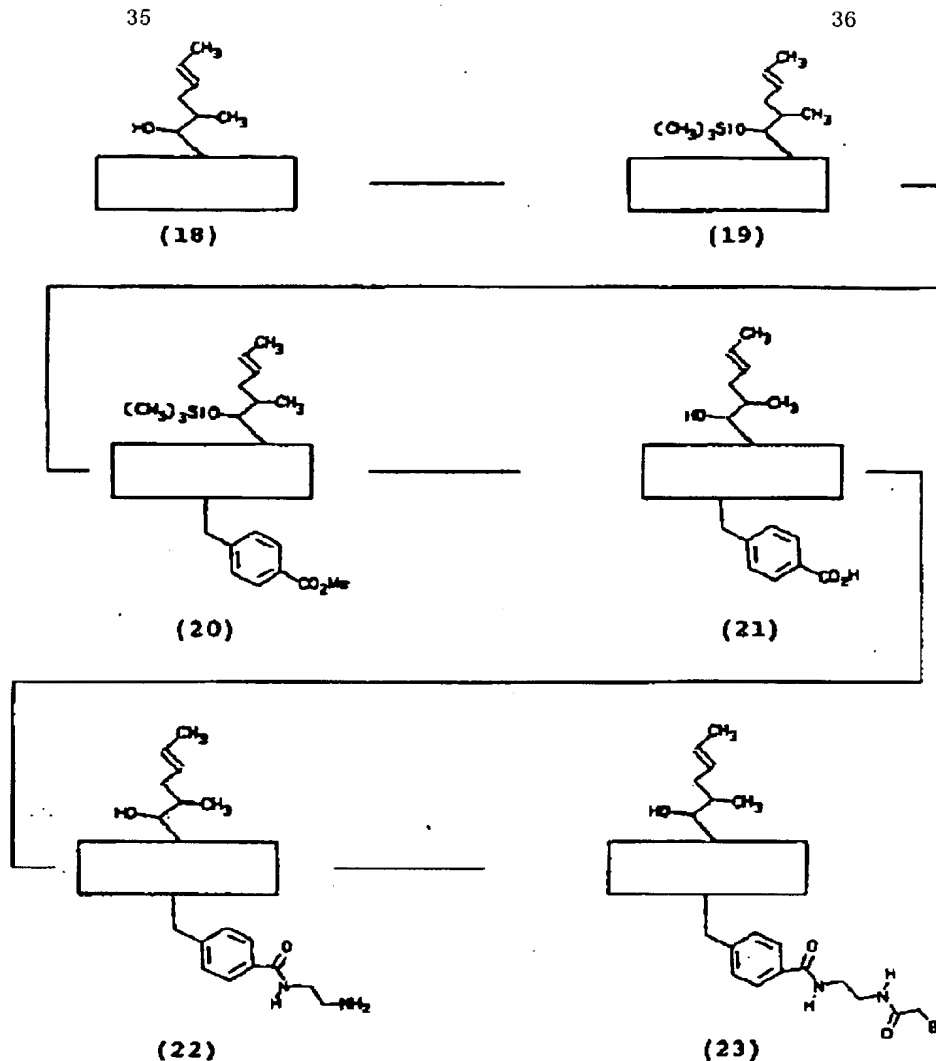


(18)

ここにおいて示される側鎖は、第1のアミノ酸残基の側鎖である。

【0129】プロモアセチルシクロスポリン (23) の調製は、次のように概略が示される：

【化15】



【0130】ここにおいて化合物(20)から(23)までは、第7のアミノ酸残基に位置する結合基を有する異性体と、第8のアミノ酸残基に位置する結合基を有する異性体との混合物(約50:50)である。

【0131】THF、ベンゼンおよびトルエンを金属ナトリウムで乾燥させ、それらの使用に先立って新たに蒸留した。融点は、Thomas Hoover Capillary融点測定装置にて測定した。すべての反応は、乾燥アルゴン雰囲気下で行なわれた。

【0132】クロロトリメチルシリルを、乾燥ピリジン(6ml)および乾燥ジクロロメタン(6ml)中のシクロクロスポリン(18)(1800mg)の攪拌溶液に、アルゴン雰囲気下に室温にて滴々加えた。添加完了後、該混合物を一夜攪拌した。次いで、該混合物を高真空下で注意深く蒸発乾燥させ、次いで白色固体残渣をジクロロメタン中に再溶解させ、シリカゲルカラム上で精製し(酢酸エチル:ヘキサン、80:20)、純粋化合物、トリメチルシリルシクロクロスポリン(19)(1700mg、89%)を白色固体として得た。融点152-156°C

【0133】乾燥トルエン(20ml)中のTMS-シ

クロスポリン(19)(900mg)の攪拌溶液に、15-クラウン-5(Aldrich)(0.3ml)を加えた。次いで、水素化ナトリウム(350mg、鉍油中の50%懸濁物)を、アルゴン雰囲気下、氷浴温度にて添加した。該混合物を攪拌し、30分間で室温まで温めた。次いで、メチルp-(プロモメチル)ベンゾエート(400mg、2.5×0.71mmol)を加え、該混合物を室温にて24時間攪拌した。次いで、酢酸エチル(150ml)を加え、引続き水(50ml)を徐々に注意して加え、更に塩酸(1N)を混合物が酸性(pH≒3.0)となるまで添加した。有機層を分離し、水(2×50ml)、飽和食塩水(100ml)で洗浄し、乾燥させた(MgSO₄)。次いで、減圧下で溶媒を除去して、粗製の化合物(20)を淡色の泡状物として得た(1.3g)。次いで、該泡状物をPTLC(シリカゲル、酢酸エチル:ヘキサン、65:35、R_f≒0.6)にて精製し、化合物メチル-p-メチルベンゾエートシクロクロスポリン(20)を、白色固体(670mg、67%)を得た。

【0134】メタノール(5ml)中のメチル-p-メチルベンゾエートシクロクロスポリン(20)(280m

g) の攪拌溶液に、水を滴々 ($\approx 1.5 \text{ ml}$) または溶液がわずかに白濁するまで添加した。炭酸カリウム (乾燥、 230 mg) を加え、該混合物を12時間攪拌し、次いで水を、溶液がわずかに白濁するまで滴々加えた。次いで、該混合物を更に12時間、室温にて攪拌した。次いで、該混合物に、溶液が酸性 ($\text{pH} \approx 2.0$) となるまで注意深く塩酸 (1 N) を加えた。次いで水 (50 ml) を加え、該混合物をジクロロメタン ($3 \times 50 \text{ ml}$) により抽出した。有機抽出物を合せ、次いで飽和食塩水 ($2 \times 50 \text{ ml}$) にて洗浄し、乾燥させた (MgSO_4)。次いで、減圧下で溶媒を除去して粗製のシクロスポリン酸 (21) (270 mg) を得た。該粗生成物をジクロロメタン (10 ml) に再度溶解し、クロマトグラフィカラム (シリカゲル) にかけた。該カラムを、まず出発物質がカラムから全て溶出するまで酢酸エチルにより溶出した。次いで、該カラムを、酢酸エチル：酢酸 ($99.9 : 0.1$) により溶出してシクロスポリン酸 (21) (160 mg 、 63%) を白色固体として得た。融点 $171-177^\circ\text{C}$ 。

【0135】乾燥DMF (3 ml) 中のシクロスポリン酸 (21) (160 mg) の攪拌溶液に、アルゴン雰囲気下で室温にてヒドロキスクシンアミド (31.2 mg) を添加した。該混合物を一夜攪拌した。TLC (シリカゲル、 $\text{MeOH} : \text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{AcOH}$ 、 $10 : 90 : 0.1$) は、酸のNHSエステルへの完全な転換を示した。

【0136】乾燥THF (3 ml) 中のエチレンジアミン (180 mg) 溶液に、上記NHSエステル溶液を30分間で添加した。該反応混合物を1時間攪拌し、次いで酢酸エチル (50 ml) により希釈した。該有機相を水 ($3 \times 50 \text{ ml}$) にて洗浄し、乾燥させた (MgSO_4)。次いで溶媒を蒸発させて乾燥させ、シクロスポリンアミン生成物 (22) を白色粉末として得た (170 mg 、 99%)。

【0137】 CH_2Cl_2 (3 ml) 中の放射標識プロモ酢酸 ($\text{C}-1^*$ 、比活性 55 mCi/mol 、 0.625 mg) の攪拌溶液に、非標識プロモ酢酸 (17.9 mg 、プロモ酢酸の全量 18.5 mg) を添加した。得

られた混合物にNHS (16.5 mg) およびDCC (29.5 mg) をアルゴン雰囲気下で氷浴温度にて添加した。該混合物を一夜攪拌し、次いで CH_2Cl_2 (2 ml) 中のシクロスポリンアミン (22) (90 mg) の溶液を加えた。該混合物を3時間攪拌した。酢酸エチル (25 ml) を加え、有機相を水にて洗浄し ($3 \times 50 \text{ ml}$)、乾燥させた (MgSO_4)。次いで溶媒を減圧下で除去し、残渣をPTLC (シリカゲル、酢酸エチル： MeOH 、 $90 : 10$) により精製して、生成物 (23) を得た (87 mg 、 89% 、比活性 $1.58 \times 10^5 \text{ CPM/mmole}$)。

【0138】例16

プロモアセチルシクロスポリンの β -ガラクトシダーゼへの接合

β -ガラクトシダーゼ (5 mg 、 9.0 nmol) の溶液を、脱気したリン酸緩衝溶液 (5 ml 、 100 mM リン酸塩、 1.0 mM MgCl_2 、 0.1% プルロン酸、 $\text{pH} 8.0$) に溶解させた。該酵素溶液を 1.0 ml の溶液に5分割した。メタノール (200 、 167 、 133 、 66 、 $0 \mu\text{l}$) を、各々酵素溶液に加えた。これらの酵素溶液に、メタノール (0 、 33 、 67 、 134 、 $269 \mu\text{l}$) 中のプロモアセチルシクロスポリン (23) (2 mg/ml) をそれぞれ加えた。この添加の終了後、約20%のメタノールおよび0、25、50、100および200当量のプロモアセチルシクロスポリンをそれぞれの酵素溶液は含んでいた。次いで、該酵素溶液を 37°C にて一夜インキュベートした。次いで、該試料をリン酸緩衝溶液 (100 mM 、 $\text{pH} 7.3$ 、 0.1% プルロン (Pluronic) 25R2、メルカプトエタノール 1 mM 、 MgCl_2 1 mM) に対して透析した。得られた酵素接合体は、それぞれ酵素あたりに0、6、10、11および24のシクロスポリンを有することを示した。

【0139】例17

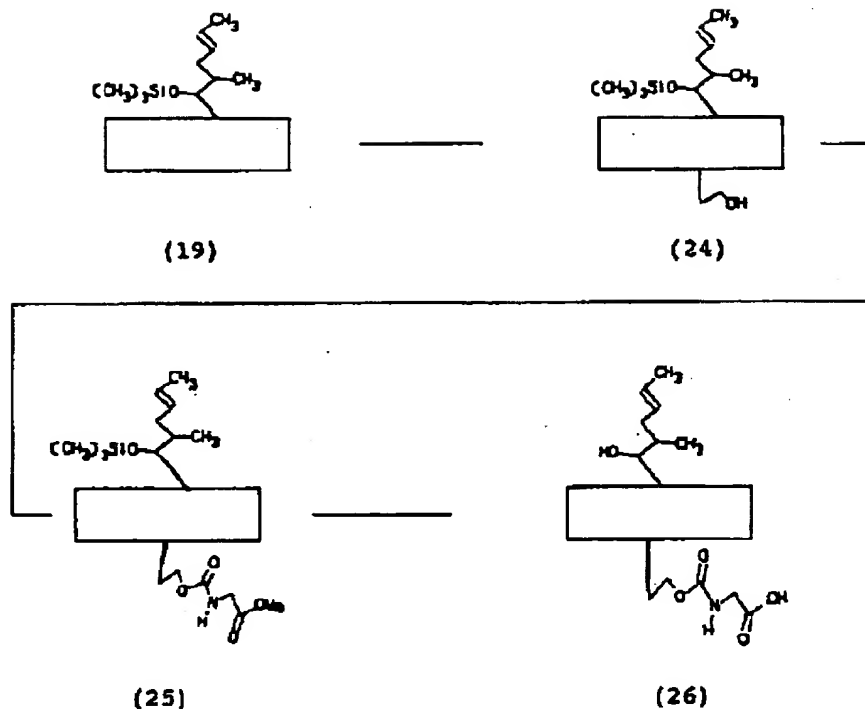
シクロスポリンカルバメートの調製

シクロスポリンカルバメート (26) の調製は、以下のように概略が示される

【化16】

39

40



【0140】ここにおいて化合物(24)から(26)までの結合基は、第7のアミノ酸残基に位置する。

【0141】水素化ナトリウム(450mg、鉱油中の50%懸濁物)を、乾燥トルエン(30ml)中のTMS-シクロスポリン(19)(1000mg)および15-クラウン-5(Aldrich)(0.2ml)の攪拌溶液に、アルゴン雰囲気下で室温にて添加した。30分後、該反応混合物を4℃に冷却し、エチレンオキシド(Fluka)(6ml)をシリンジにて添加した。該反応フラスコを密栓(栓とパラフィルムにより封止)し、室温にて24時間攪拌した。次いで、該反応混合物を水(100ml)により注意深く処理し、次いで塩酸(1N)により酸性化し、ジクロロメタン(200ml)を添加した。有機層を分離し、水(100ml)により洗浄し、乾燥させた(MgSO₄)。次いで溶媒を減圧下で除去し、粗生成物を白色固形物として得た。該粗生成物をカラムクロマトグラフィ(シリカゲル、酢酸エチル)を用いて精製し、ヒドロキシエチルシクロスポリン(24)を白色固体として得た(350mg、34%)。融点124-132℃。

【0142】メチルグリシネート イソシアネートを、乾燥トルエン(2ml)中のヒドロキシエチルシクロスポリン(24)(300mg、0.23mmol)およびトリn-ブチルスズエトキシド(Aldrich)

(154mg、0.4mmol)の攪拌溶液に、アルゴン雰囲気下で室温にて添加した。該反応混合物を2時間攪拌した。次いで、酢酸エチル(50ml)および水(50ml)を添加した。有機層を分離し、飽和食塩水：水混合物(1：1、2×50ml)により洗浄し、

乾燥させた(MgSO₄)。減圧下で有機相を除去し、泡状固形物をカラムクロマトグラフィ(シリカゲル、酢酸エチル)により精製し、純粋シクロスポリンエステル誘導体(25)(280mg、85%)を得た。

【0143】メタノール(10ml)中のエステル(25)(250mg)の攪拌溶液に、混合物がわずかに白濁するまで水を添加した。次いで、炭酸カリウム(200mg、無水)を添加し、該混合物をアルゴン雰囲気下で室温にて一夜攪拌した。次いで、該混合物をジクロロメタン(3×75ml)により抽出した。合せられた有機抽出物を飽和食塩水(100ml)にて洗浄し、乾燥させた(MgSO₄)。次いで溶媒を減圧下で除去してヒドロキシエチルカルバメート酸(26)を白色固形物として得た(220mg、96%)。融点156-166℃。

【0144】例18

シクロスポリンカルバメートのβ-ガラクトシダーゼへの接合

シクロスポリンカルバメート酸(26)をDMF中でDCCおよびNHSと反応させ、DMF中のNHSエステル(13.5mg/ml)の溶液を得た。

【0145】β-ガラクトシダーゼ(5mg)の溶液を、脱気したリン酸緩衝溶液(5ml、100mMリン酸塩、1.0mM MgCl₂、0.1%Pluronic 25R2、pH8.0)に溶解させた。該酵素溶液を1.0ml溶液に5分割した。メタノール(200、197、195、190および180μl)を、それぞれの酵素溶液に加えた。これらの酵素溶液に、乾燥DMF中のシクロスポリンカルバメート-NHSエステル

(13.5 mg/ml, 0.01 mM) の溶液を添加した(それぞれ、0、2.5、5、10および20 μl)。これらの添加後、各酵素溶液は、約20%のメタノールならびに0、25、50、100および200当量のシクロスポリンカルバメートをそれぞれ含有した。次いで、該酵素溶液を4℃にて一夜インキュベートした。次いで、該酵素溶液を、リン酸緩衝溶液(100 mM, pH 7.3, 0.1% Pluronic 25R2, MgCl₂ 1 mM) に対して3回透析した。各試料の濃度は、(U. V. によって) 0.7 mg/mlと測定された。

【0146】例19

無作為標識抗-ジゴキシン抗体-デオキシガラクトスタチン阻害剤接合体およびチオール標識ジゴキシン-ガラクトシダーゼ接合体を用いるジゴキシンのアッセイ
アッセイ緩衝溶液は、0.1 Mリン酸ナトリウム、1 mM塩化マグネシウム、pH 7.5であり、1 mg/ml*

試料中のジゴキシン

の濃度 (μM)

0

2

抗体無添加

【0147】例20

アフィニティー標識デオキシガラクトスタチン阻害剤-抗体接合体およびアミン-標識ジゴキシン-ガラクトシダーゼ接合体を用いるジゴキシンのアッセイ
アッセイ緩衝溶液は、0.1 Mリン酸ナトリウム、1 mM塩化マグネシウム、pH 7.5であり、1 mg/mlのウシ血清アルブミンを含有していた。アフィニティー標識阻害剤-抗体接合体(50 μlの1.06 μM溶液)および試料(50 μl)を、アッセイ緩衝溶液(400 μl)と混合し、室温にて2分間インキュベートし※

試料中のジゴキシン

の濃度 (μM)

0

0.475

抗体無添加

【0148】例21

無作為標識抗-シクロスポリン抗体-デオキシガラクトスタチン阻害剤接合体およびアミン-標識シクロスポリン-ガラクトシダーゼ接合体を用いるシクロスポリンのアッセイ

アッセイ緩衝溶液は、0.1 Mリン酸ナトリウム、1 mM塩化マグネシウム、pH 7.1であり、1 mg/ml

*のウシ血清アルブミンを含有していた。アフィニティー精製非還元ポリクローナル抗体(R1273)を使用した。無作為標識阻害剤-抗体接合体(50 μlの400 nM溶液)および試料(50 μl)を、アッセイ緩衝溶液(400 μl)と混合し、室温にて10分間インキュベートした。チオール標識ジゴキシン-ガラクトシダーゼ接合体(50 μlの0.25 nM溶液)および追加のアッセイ緩衝溶液(200 μl)を加え、得られた溶液を室温にて20分間インキュベートした。37℃における酵素活性を、クロロフェノールレッドガラクトシド(50 μlの0.13 M溶液)および追加のアッセイ緩衝溶液(200 μl)の添加、ならびに定温度分光光度計での575 nmにおける吸光度増大速度の測定により測定した。下記のように、酵素活性はジゴキシン濃度の関数であった

【表1】

酵素活性

(mA/min)

58

89

97

※た。ジゴキシン-標識ガラクトシダーゼ(50 μlの1 nM溶液)および追加のアッセイ緩衝溶液(200 μl)を加え、得られた溶液を室温にて1時間インキュベートした。25℃における酵素活性を、ONPG(50 μlの0.6 mM溶液)および追加のアッセイ緩衝溶液(200 μl)の添加、ならびに定温度分光光度計での405 nmにおける吸光度増大速度の測定により測定した。以下に示すように、酵素活性は、ジゴキシン濃度の関数であった。

【表2】

酵素活性

(mA/min)

48

57

72

のウシ血清アルブミンを含有していた。使用した抗体は、モノクローナル還元、アルキル化抗-シクロスポリン抗体であった。無作為標識抗-シクロスポリン抗体-阻害剤接合体(50 μlの12.5 nM溶液)および試料(0.05%のPluronic 25R2を含む55 mMトリス、pH 8.0緩衝溶液に溶解されたシクロスポリン溶液50 μl)を、アッセイ緩衝溶液(400

μl)と混合し、室温にて2分間インキュベートした。アミン標識シクロスポリン-ガラクトシダーゼ接合体(50 μl の5 nM溶液)および追加のアッセイ緩衝溶液(200 μl)を加え、得られた溶液を室温にて15分間インキュベートした。37℃における酵素活性を、クロロフェノールレッドガラクトシド(50 μl の40 mg/ml溶液)および追加のアッセイ緩衝溶液(20*

試料中のシクロスポリン

の濃度 (nM)

0

4

8. 3

17

33

58

83

抗体無添加

【0150】例22

無作為一標識抗-シクロスポリン抗体-デオキシガラクトスタチン阻害剤接合体およびチオール-標識シクロスポリン-ガラクトシダーゼ接合体を用いるシクロスポリンのアッセイ

アッセイ緩衝溶液は、0.1Mリン酸ナトリウム、1mM塩化マグネシウム、pH7.1であり、1mg/ml 30のウシ血清アルブミンを含有していた。使用した抗体は、モノクローナル還元、アルキル化抗-シクロスポリン抗体であった。該無作為一標識抗-シクロスポリン抗体-阻害剤接合体(50 μl の100 nM溶液)および試料(0.05%のPluronic 25R2を含む55 mMトリス、pH8.0緩衝溶液に溶解されたシクロ※

試料中のシクロスポリン

の濃度 (nM)

0

333

抗体無添加

【0151】例23

無作為一標識還元、アルキル化ポリクローナル抗-ジゴキシン抗体-阻害剤接合体およびアミン-標識ジゴキシン-ガラクトシダーゼ接合体を用いるジゴキシンのアッセイ

アッセイ緩衝溶液は、0.08Mリン酸ナトリウム、50

*0 μl)の添加、ならびに定温度分光光度計での575 nmにおける吸光度増大速度の測定により測定した。以下に示すように、酵素活性はシクロスポリン濃度の関数であった。

【0149】

【表3】

酵素活性

(mA/min)

198

200

205

211

214

219

220

222

※スポリン溶液50 μl)を、アッセイ緩衝溶液(400 μl)と混合し、室温にて2分間インキュベートした。チオール-標識シクロスポリン-ガラクトシダーゼ接合体(50 μl の8 nM溶液)および追加のアッセイ緩衝溶液(200 μl)を加え、得られた溶液を室温にて15分間インキュベートした。37℃における酵素活性を、クロロフェノールレッドガラクトシド(50 μl の40 mg/ml溶液)および追加のアッセイ緩衝溶液(200 μl)の添加、ならびに定温度分光光度計での575 nmにおける吸光度増大速度の測定により測定した。以下に示すように酵素活性は、シクロスポリン濃度の関数であった。

【表4】

酵素活性

(mA/min)

166

203

214

0.12Mリン酸カリウム、0.02Mナトリウムアジド、8mM EGTA、1.7mM酢酸マグネシウム、1%エチレングリコール、0.04%トウイーン20、0.005%ポリオキシエチレン9ラウリルエーテル、0.01%Pluronic 25R2、pH7.0であった。

45

【0152】試料（ジゴキシン標準、Syva Company、 $25\mu\text{l}$ ）、無作為一標識抗—ジゴキシングラクトスタチン—抗体接合体（ $100\mu\text{l}$ の 0.5nM 溶液）および水（ $25\mu\text{l}$ ）を混合し、 37°C において125または195秒間インキュベートした。アミン—標識ジゴキシングラクトシダーゼ接合体（ $25\mu\text{l}$ ）を加え、得られた溶液を 37°C にて100秒間インキュベートした。 37°C における酵素活性を、クロロフェノー*

試料中のジゴキシン

の濃度 (ng/ml)

0

0.5

1

2

3

4

抗体無添加

【0154】以下のデータは、デオキシガラクトスタチン阻害剤—標識還元アルキル化ポリクローナル抗体を用いたジゴキシンのアッセイにより得た。試料および抗体※

試料中のジゴキシン

の濃度 (ng/ml)

0

0.5

1

2

3

4

抗体無添加

【0155】以下のデータは、チオガラクトシド阻害剤—標識還元アルキル化ポリクローナル抗体を用いたジゴキシンのアッセイにより得た。試料および抗体を975

46

*ルレッドガラクトシド（ $12.5\mu\text{l}$ の 98mM 溶液）および追加の水（ $37.5\mu\text{l}$ ）の添加、ならびに、定温度分光光度計での 550nm における吸光度増大速度の測定により測定した。

【0153】以下のデータは、デオキシガラクトスタチン阻害剤—標識天然ポリクローナル抗体を用いて得た。試料および抗体を、125秒間インキュベートした。

【表5】

酵素活性

(mA/min)

68

70

71

75

75.5

77

82

※を、125秒間インキュベートした。

【表6】

酵素活性

(mA/min)

52

55

58

66

70

74

82

40秒間インキュベートした。

【表7】

47

試料中のジゴキシンの
濃度 (ng/ml)

0

0.5

1

2

3

4

抗体無添加

【0156】以下のデータは、デオキシガラクトスタチン阻害剤-標識還元アルキル化モノクローナル抗体を用いたジゴキシンのアッセイにより得た。試料および抗体*

試料中のジゴキシンの
濃度 (ng/ml)

0

0.5

1

2

3

4

抗体無添加

【0157】例2.4

アセチルコリンエステラーゼ阻害剤-標識抗体の調製
1, 10-ジアミノデカン、エタノール中で1当量の
コハク酸モノアルデヒドのエチルエステルと共に加温し
た。次いでナトリウムシアノボロハイドライド (4当
量) を加え、該溶液を、HCl水溶液の添加によりpH
を6に保ちつつ室温に24時間放置した。

【0158】該反応混合物を炭酸ナトリウム水溶液によ
り希釈し、生成物を塩化メチルで抽出した。合せられた
有機抽出物を乾燥させ (MgSO₄)、そして蒸発乾燥
させてN-カルボキシプロピル-1, 10-ジアミノデ
カンのエチルエステルを得た。

【0159】残渣をDMFに溶解させ、ヨウ化メチル
(100当量) および1, 2, 2, 6, 6-ペンタメチ
ルピペリジン (10当量) を添加した。Sommer, J. Org. Chem. 36: 824 (1971) 参
照。数時間後、アセトンを添加し、沈殿をろ過した。次
いで残渣をアセトン中の6%DMFを用いて1時間還流
し、ろ過し、アセトンで洗浄してN-カルボキシプロピ

48

酵素活性

(mA/min)

51

53

54

60

68

68.5

82

*を975秒間インキュベートした。

【表8】

酵素活性

(mA/min)

57.5

58.7

58.9

63.7

64.6

66.7

82

ル-N, N, N', N', N'-ペンタメチル-1, 10-ジアミノデカンエチルエステル (N-カルボキシプロ
ピル-N, N, N', N', N'-ペンタメチル-1, 10-デカンジアミニウムヨウ化物のエチルエステ
ルとしても知られている) を得た。該エステルを水酸化
ナトリウム (0.1M) に溶解させ、1時間後に該溶液
をHCl (1N) を用いてpH3に酸性化し、ろ過し、
凍結乾燥した。残留する酸は、DMSOに溶解させた。
NHSエステルへの活性化および抗-ジゴキシンの抗体の
標識は、例6と同様に行なった。

【0160】例2.5

ジゴキシンの標識アセチルコリンエステラーゼの調製

これは、β-ガラクトシダーゼの標識について例8で示
したのと同様に行なわれる。

【0161】例2.6

ジゴキシンの阻害剤-標識抗体およびジゴキシ
ン-標識アセチルコリンエステラーゼを使用するジゴキシ
ンのアッセイ

アッセイ緩衝溶液は、0.1Mリン酸ナトリウム、0.

1M塩化カリウム、pH8であり、1mg/mlのウシ血清アルブミンを含有した。無作為一標識阻害剤-抗体接合体(50 μ lの400mM溶液)および試料(50 μ l)を、アッセイ緩衝溶液(400 μ l)と混合し、室温にて10分間インキュベートした。ジゴキシン-標識アセチルコリンエステラーゼ接合体(50 μ lの1.5単位/ml溶液)および追加のアッセイ緩衝溶液(200 μ l)を加え、得られた溶液を室温にて20分間インキュベートした。25℃における酵素活性を、リン酸緩衝溶液(0.1M、pH7)中のアセチルチオコリン*10

*ヨウ化物(8mM)および5, 5-ジチオービス(2-ニトロ安息香酸)(6.4mM)の溶液50 μ l、ならびに追加のアッセイ緩衝溶液(200 μ l)の添加により測定した。吸光度増大速度を、410nmにおいて25℃にて測定した。酵素活性は、ジゴキシン濃度の関数であった。

【0162】本発明を、明確化および理解のために、例示および例によってある程度詳細に記述したが、特許請求の範囲の権利範囲のうちである種の変更または修飾を行ない得ることは自明であろう。

フロントページの続き

(72)発明者 ロハン ベリーズ
アメリカ合衆国カリフォルニア州マウンテンビュー、ダルマドライブ 108
(72)発明者 ダリウシュ ダバリアン
アメリカ合衆国カリフォルニア州サンジョゼ、ロムフォードドライブ 5363

(72)発明者 カール エヌ. スコルド
アメリカ合衆国カリフォルニア州マウンテンビュー、デルアベニュー 2487
(72)発明者 エドウィン エフ. ウルマン
アメリカ合衆国カリフォルニア州アサートン、セルビレーン 135
(72)発明者 ケサバン ラディカ
アメリカ合衆国カリフォルニア州マウンテンビュー、ナンバー16、レングストーフアベニュー 575